

생리활성 조절 단백질의 효능 향상 방법 및 그 예시 변이체들
 {A METHOD OF IMPROVING EFFICACY OF BIOLOGICAL RESPONSE-MODIFYING PROTEINS
 AND THE EXEMPLARY MUTEINS}

5 기술분야

본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 사람 사이토카인 단백질에서
 10 해당 수용체와의 결합에 관여하는 알파 나선 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체에 관한 것이다.

종래기술

15 사람의 질병 중 상당수는 단백질의 결합에 의한 기능 상실 또는 단백질 양의 부족 등으로 인하여 유발되고 있다. 이러한 질병을 치료하기 위해서 사람에게 직접 단백질을 투여하는 방식이 이용되고 있다. 그러나, 이처럼 의약품으로 사용되고 있는 많은 생리활성 단백질들은 대부분 목적인 조직에 도달하여 작용하기 전에 혈청내에서 쉽게 분해되기 때문에 이들 물질을
 20 사용하는 환자들은 생리활성 단백질이 체내에서 작용을 할 수 있는 일정 수준의 농도를 유지하기 위해 과량 및 잦은 투여를 받아야 하는 등의 문제점이 있었다.

상기 문제점을 해결하기 위한 하나의 접근 방식은 생리활성 조절 단백질을 폴리에틸렌글리콜과 접합시키거나 마이크로 캡슐화하는 것이다.
 25 그러나 이들 방법은 1차로 단백질을 미생물로부터 생산 및 정제한 후, 부가반응을 수행하여야 하는 번거로움을 수반하게 된다. 또한 원하지 않는 위치에서 교차 연결(cross-linking)이 일어날 수 있으며 최종 생산물의 동질성(homogeneity)에 문제점이 있을 수 있다.

다른 접근 방법은 당쇄화(glycosylation)를 이용하는 것이다. 세포 표면 단백질 및 진핵 세포에 의해 생산되는 분비 단백질들은 당쇄화에 의해서 수식(modification)된다. 당쇄화는 단백질의 물리적 성질은 물론, 생체 내에서의 안정성 및 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나, 당쇄화된 단백질은 당쇄화를 수행할 수 있는 진핵 세포를 통해서 제조할 수 있으므로 제조방법이 까다로우며, 목적인 위치에 모두 당쇄화가 이루어진 동질의 최종 생산물을 수득하기 어렵다.

아울러, 이러한 종래기술들은 모두 투여 회수로 인한 제반 문제를 개선하는데는 도움이 되었으나 단백질의 생리활성 효능(efficacy)을 높이는 문제는 개선하지 못함으로써 과량투여의 문제를 남기고 있다. 예를 들면, Amgen사가 개발한 NESP(미국특허공보 제 6,586,398호)의 경우 혈중 반감기의 개선으로 잦은 투여의 문제는 다소 해결되었으나 효능을 증대시키는데 실패함으로써 여전히 1회 투여량이 과다하여 발생하는 차단항체 생성이라는 문제가 여전히 남아있는 상태이다.

생리활성 단백질의 효능을 향상시키기 위한 접근 방식으로서 야생형 단백질의 일부 아미노산을 돌연변이시켜 생물학적 활성을 개선시키는 방법이 이용되고 있다. 이러한 변이체와 관련하여 하기의 특허문헌들이 개시되어 있다: (1) 미국특허공보 제 5,457,089호-에리스로포이에틴과 이의 수용체 간의 결합력을 증진시키기 위해서 에리스로포이에틴의 카르복시기 말단을 돌연변이시킨 에리스로포이에틴 변이체; (2) 국제특허공보 제 02/077034호-사람에게 투여되었을 때 면역반응을 줄이기 위해서 T-세포 에피토프를 돌연변이시킨 과립구 형성인자 변이체; (3) 국제특허공보 제 99/57147호-사람의 성숙한 TPO 단백질의 7번째 아미노산부터 151번째 아미노산을 포함하는 TPO 단백질에 있어서, 115번째 아미노산인 글루탐산을 리신, 아르기닌 또는 티로신으로 치환한 트롬보포이에틴 변이체; 및 (4) 미국특허공보 제 6,136,563호 및 6,022,711호-18, 22, 25, 26, 29, 65, 168 및 174번째 아미노산을 알라닌으로 치환하여 효능을 증가시킨 사람 성장 호르몬 변이체.

그러나, 전술한 단백질 변이체는 생체 내에서의 항원성 변화는

고려하지 않고 단지 효능 개선만을 위해서 만들어진 변이된(altered) 형태이다. 따라서 그 변이의 규모, 정도 및 위치가 사람내에서 항원성을 유발할 가능성이 매우 높다. 일단 사람내에서 항원성을 일으키면 심각한 부작용을 초래하게 된다(Casadevall et al. N. Eng. J. Med. 2002, vol.346, 5 p.469).

발명의 요약

따라서, 본 발명의 목적은 기존의 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 효능을 개량하여 투여시 생리활성 조절작용의 효과는 극대화하고 차단항체의 생성도 방지할 수 있는 개선된 약리작용을 갖는 생리활성 조절작용 단백질 변이체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

한 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 제공한다.

다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA를 제공한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터를 제공한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 제공한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여

생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리하는 단계를
5 포함한 단백질 변이체의 제조방법을 제공한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

10

도면의 간단한 설명

도 1A는 4-나선 다발 추가계 소속 사이토카인에서 해당 수용체와의 결합에 관여하는 도메인내 아미노산 서열을 비교 나열한 것이다.

15 도 1B는 인터페론에서 해당 수용체와의 결합에 관여하는 도메인내 아미노산 서열을 비교 나열한 것이다.

도 2A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 웨스턴 블로팅 결과(왼쪽 레인부터 마커; 야생형 TPO; TPO-[F46V]; TPO-[F128V]; TPO-[F131V]; TPO-[F141V])를 나타낸 것이다.

20 도 2B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 웨스턴 블로팅 결과(왼쪽 레인부터 마커; 야생형 EPO; EPO-[F48V]; EPO-[F138V]; EPO-[F142V]; EPO-[F148V])를 나타낸 것이다.

도 2C는 본 발명에 따른 G-CSF 변이체의 웨스턴 블로팅 결과(왼쪽 레인부터 마커; 야생형 G-CSF; G-CSF-[F13V]; G-CSF-[F83V]; G-CSF-[F113V];
25 G-CSF-[F140V]; G-CSF-[F144V]; G-CSF-[F160V])를 나타낸 것이다.

도 3A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 상대적인 발현양을 야생형 TPO와 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 3B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 상대적인 발현양을 야생형 EPO와

비교하여 나타낸 그래프이다.

도 3C는 본 발명에 따른 G-CSF 변이체의 상대적인 발현양을 야생형 G-CSF와 비교하여 나타낸 그래프이다.

5 도 4A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA 검사법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA 검사법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4C는 본 발명에 따른 G-CSF 변이체의 G-CSF 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA 검사법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

10 도 4D는 본 발명에 따른 GH 변이체의 GH 수용체에 대한 결합 친화력을 ELISA 검사법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 SPR 기법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

15 도 5B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 SPR 기법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 TPO 수용체에 대한 결합 친화력을 FACS로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 EPO 수용체에 대한 결합 친화력을 FACS로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

20 도 7A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 농도에 따른 TF-1/*c-Mpl* 세포의 증식정도를 나타낸 그래프이다.

도 7B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 농도에 따른 TF-1 세포 증식정도를 나타낸 그래프이다.

25 도 7C는 본 발명에 따른 G-CSF 변이체의 농도에 따른 HL60 세포의 증식정도를 나타낸 그래프이다.

도 7D는 본 발명에 따른 GH 변이체의 농도에 따른 Nb2 세포의 증식정도를 나타낸 그래프이다.

도 8A는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 약물동력검사를 위하여 토끼에

정맥주사한 후 시간별로 혈청내 TPO 변이체의 농도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8B는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 약물동력검사를 위하여 토끼에 정맥주사한 후 시간별로 혈청내 EPO 변이체의 농도를 측정한 결과를 나타낸
5 그래프이다.

도 8C는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 약물동력검사를 위하여 마우스에 복강주사한 후 시간별로 혈청내 EPO 변이체의 농도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9A, 9B 및 9C는 각각 본 발명에 따른 EPO 변이체의 생체내 활성을
10 확인하기 위하여 마우스에 복강주사한 후 시간별로 적혈구, 망상 적혈구의 증식정도 및 Hematocrit의 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10A, 10B 및 10C는 각각 본 발명에 따른 TPO 변이체의 생체내 활성을 확인하기 위하여 래트에 복강주사한 후 시간별로 혈소판, 백혈구, 중성구의 증식정도를 나타낸 그래프이다.

15

발명의 상세한 설명

본 발명의 명세서에서 사용된 아미노산 일문자는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:

- 20 A: 알라닌; B: 아스파라긴 또는 아스파르트산; C: 시스테인;
D: 아스파르트산; E: 글루탐산; F: 페닐알라닌;
G: 글라이신; H: 히스티딘; I: 이소루신; K: 리신; L: 류신;
M: 메티오닌; N: 아스파라긴; P: 프롤린; Q: 글루타민;
R: 아르기닌; S: 세린; T: 쓰레오닌; V: 발린;
25 W: 트립토판; Y: 티로신; Z: 글루타민 또는 글루탐산.

본 발명의 명세서에 표기되는 "(아미노산일문자)(아미노산 위치)
(아미노산일문자)"는 주어진 단백질의 해당 아미노산 위치에서 선행 표기된

아미노산이 후행 표기된 아미노산으로 치환된다는 것을 의미한다. 예를 들면, F48V는 주어진 단백질의 아미노산 잔기 48번째에 해당하는 페닐알라닌이 발린으로 치환된다는 것을 가리킨다. 상기 아미노산 위치는 성숙한(mature) 야생형(wild type) 단백질의 N-말단에서부터 번호를 매긴(numbered) 것이다.

5 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 "단백질 변이체"는 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질에 있어서, 상기 수용체, 리간드 또는 기질과의 결합에 관여하는 도메인에 있는 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환하여, 야생형 단백질의 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열을 갖게 된 단백질을 말한다. 본 발명에서 단백질 변이체는
10 편의상 "단백질 명칭-[(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)]"로 표기할 수 있다. 예를 들면, 야생형 TPO의 131번째 아미노산인 페닐알라닌이 발린으로 치환된 TPO 변이체는 TPO-[F131V]로 표기된다.

본 발명의 명세서에서 "생리활성 조절작용 단백질"은 다세포로 이루어진 생체내에서 일어나는 여러 가지 생물학적 활성들이 개시 또는
15 중단되도록 유도하고 이들이 유기적으로 연관되도록 조절해서 생체가 항상성을 유지하도록 하는데 관여하는 단백질들을 의미한다. 이러한 단백질들은 보통 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하는 과정을 수반한다.

본 발명에 따라 변이될 수 있는 단백질은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 고유의 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질을 모두 포함한다.
20 예를 들면, 이에 한정되는 것은 아니지만, 사이토카인, 사이토카인 수용체, 접착 분자(adhesion molecules), 종양 괴사 인자(TNF) 수용체, 효소, 수용체 티로신 키나제, 케모카인 수용체, 기타 세포 표면 단백질, 가용성 리간드 등이 포함된다. 사이토카인은 이들로 한정되는 것은 아니지만 CNTF(cytoneurotrophic factor), GH(growth hormone), IL-1, IL-1Ra(interleukin-1 receptor antagonist), placental lactogen(PL),
25 cardiolipin, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-17, TNF(tumor necrosis factor), TGF(transforming growth factor), IFN(interferon), GM-CSF(granulocyte-monocyte colony stimulating factor), G-

CSF(granulocyte colony stimulating factor), EPO(erythropoietin), TPO(thrombopoietin), M-CSF(monocyte colony stimulating factor), LIF(leukemia inhibitory factor), OSM(oncostatin-M), SCF(stem cell factor), HGF(hepatocyte growth factor), FGF(fibroblast growth factor) 및 IGF(insulin-like growth factor), LPT(Leptin) 등을 포함한다. 사이토카인 수용체는 이들로 한정되는 것은 아니지만 성장호르몬 수용체(GHR), IL-13R, IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-15R, TNFR, TGFR, IFNR(예, IFN- γ R α -쇄, IFN- γ R β -쇄), 인터페론- α R, - β R 및 - γ R, GM-CSFR, G-CSFR, EPOR, cMpl, gp130, Fas(Apo 1) 등을 포함한다.

10 케모카인 수용체의 예로는 CCR1, CXCR1-4를 들 수 있다. 수용체 티로신 키나제의 예로는 TrkA, TrkB, TrkC, Hrk, REK7, Rse/Tyro-3, 간세포 성장 인자 R, 혈소판-유래된 성장 인자 R, Flt-1이 포함된다. 다른 세포 표면 단백질의 예로는 CD2, CD4, CD5, CD6, CD22, CD27, CD28, CD30, CD31, CD40, CD44, CD100, CD137, CD150, LAG-3, B7, B61, β -뉴렉신, CTLA-4, ICOS, ICAM-1,

15 보체 R-2(CD21), IgER, 리소좀막 gp-1, α 2-마크로글로불린 수용체-연관된 단백질, 나트륨배설 펩타이드 R을 들 수 있다.

본 발명은 상기된 바와 같은 생리활성 조절작용을 나타내는 수많은 단백질을 대상으로, 상기 생리활성 조절작용의 효능을 증가시키기 위해서 수용체, 리간드 또는 기질에 대하여 야생형 보다 증가된 소수성 인력(hydrophobic force)으로 결합할 수 있는 단백질 변이체를 제공하고자 하며, 이를 위해서 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것을 특징으로 한다.

20

페닐알라닌은 방향족의 곁사슬을 가진 상대적으로 비극성인 아미노산으로, 공지된 소수성 지표는 3.0인데 반하여, 발린은 비극성이고 소수성인 지방족 곁사슬을 가진 아미노산으로, 공지된 소수성 지표는 4.0이다.

25 또한 발린은 페닐알라닌 보다 작은 크기를 갖고 있기 때문에 발린으로 치환된 단백질은 해당 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하는 포켓(pocket)이 깊어지게 된다. 따라서, 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한

단백질은 소수성 인력이 증가되고 공간적 깊이가 더해짐에 따라 수용체, 리간드 또는 기질과의 결합 친화력은 증가하게 되어 목적인 생리활성 조절작용의 효능을 증가시킬 수 있을 것이다.

아울러, 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것은 보존적 치환으로서, 이러한 치환은 단백질의 2차 또는 3차 구조에 최소한의 영향을 미치기 때문에 단백질의 기능 자체에는 거의 영향을 미치지 않는다(Argos, EMBO J. 1989, vol.8, pp779-85). 더 나아가, 페닐알라닌은 주로 소수성이 높은 영역에 존재하기 때문에 단백질 표면으로 거의 노출되지 않는데 이를 발린으로 치환하면 발린은 페닐알라닌 보다 소수성이 더 높기 때문에 단백질의 표면으로부터 더욱 함몰되게 되어 이러한 치환으로 인한 항체유발 가능성은 더욱 낮아지게 된다. 따라서, 임의의 단백질이 특유의 생리활성 조절작용을 나타내기 위해서는 먼저 수용체, 리간드 또는 기질과 결합해야만 하며, 이 결합이 강할수록 상기 생리활성 조절작용의 효능(efficacy)이 증가되는 경우에, 이와 관련된 단백질들은 모두 본 발명에 따라 변이될 수 있으며, 본 발명은 이러한 단백질 변이체를 모두 포함한다.

이러한 페닐알라닌을 발린으로 치환함으로써 결합 친화력이 증대되는 사실은 실제로 사람 자가면역질환에서 NK 세포에서 발현되는 FcγRIIIa(CD16) 단백질에서 돌연변이의 발견으로 더욱 뒷받침되고 있다. 즉, 사람의 이 수용체 단백질의 아미노산 중에서 이 단백질 수용체의 리간드인 항체의 Fc를 인식 및 결합하는 부위에 존재하는 176번째 아미노산이 페닐알라닌인 사람과 발린인 사람으로 나누어지는데(polymorphism), 이 중 페닐알라닌인 사람은 리간드인 항체 Fc부위와 결합력이 약화되어 그 기능을 제대로 못함으로써 SLE(systemic lupus erythematosus)라는 질병에 걸릴 확률이 매우 높아지게 된다는 사실이다(Jianming Wu et al. J. Clin. Invest. 1997, vol.100, pp.1059-70).

한편, 앞서 주지된 바와 같이 본 발명은 생리활성 조절작용 단백질의 결합 도메인을 이루는 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 명세서에서 "결합 도메인"이란 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하는 기능을 수행하는 단백질의 일부분(즉, 도메인)을

의미하며, 단백질의 다른 부분에 비해 소수성(hydrophobicity)이 높고
항원성이 낮은 편이다. 단백질의 결합 도메인은 당업계에 널리 공지되어
있으며, 예를 들면 본 발명의 일실시예에 해당하는 일부 4-알파 나선 다발
소속 사이토카인은 D-알파 나선구조가, 인터페론의 경우는 A-알파 나선구조가
5 해당 수용체와의 결합 도메인으로 알려져 있다.

그러나 본 발명에 따라 변이되는 결합 도메인은 당업계에 공지된 결합
도메인에만 국한되지 않는다. 왜냐하면, 수용체, 리간드 또는 기질과
생리활성 조절작용 단백질의 결합에는 직접 접촉하는 아미노산 잔기 이외에도
여러 아미노산 잔기가 영향을 미치기 때문이다. 본 발명에 따라 변이되는
10 생리활성 조절작용 단백질의 “결합 도메인”은 당업계에 공지된 결합
도메인의 양 말단으로부터 약 50개의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 25개의
아미노산 잔기, 보다 바람직하게는 약 10개의 아미노산 잔기를 추가로
포함하는 형태이다.

본 발명의 한 양태는 사이토카인에 관한 것으로, 사이토카인은
15 일반적으로 수 개의 알파 나선을 포함하고 있으며, 이들 중 N-말단에서부터
첫번째와 마지막 나선이 해당 사이토카인 수용체와의 결합 도메인으로 알려져
있다(도 1참조). 각 사이토카인마다 해당 수용체와 결합하는 알파 나선은
다르지만, 또한, 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 IL-2의 경우 두번째와
다섯번째 나선은 IL-2의 수용체중 p55알파 수용체와 결합하는 나선이고,
20 첫번째 나선은 IL-2의 수용체중 p75감마 수용체와 결합하며, 여섯번째 나선은
감마 수용체와 결합하게 된다(Fernando Bazan, Science J. 1992, vol.257,
pp.410-2). 이처럼 사이토카인마다 특유의 결합에 관여하는 나선이
존재하지만 이들의 아미노산 서열을 비교해보면 매우 보존적인 서열이
존재한다. 본 발명은 사이토카인의 결합 도메인에 해당하는 알파 나선에 있는
25 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜서, 사이토카인 수용체에 대하여 야생형
사이토카인보다 높은 결합 친화력으로 결합할 수 있는 사이토카인 변이체를
제공한다.

상기 사이토카인과 관련된 한 양태는 4-나선 다발 추가계 소속

사이토카인에 관한 것이다. 이러한 사이토카인에는 CNTF, EPO, Flt3L, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, G-CSF, GHR 및 IFN 등이 포함된다. 이들은 모두 4개의 알파 나선을 포함하는 특징을 갖고 있으며, 여기서 4개의 알파 나선은 N-말단에서부터 A-
5 알파 나선, B-알파 나선, C-알파 나선, D-알파 나선으로 명명되어있다. 주로 D- 및 A-알파 나선이 수용체와 결합하는데 관여하는 도메인으로 알려져 있다(Fernando Bazan, Immunology today, 1990, vol.11 pp.350-4, The Cytokine Facts Book, 1994, pp.104-247).

전술한 4-나선 다발 추가계 소속 사이토카인 중 CNTF, EPO, Flt3L, GM-
10 CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, G-CSF 및 GHR의 결합 도메인은 D-알파 나선은 물론 D-알파 나선과 C-알파 나선이 연결되는 부분을 포함한다. 보다 구체적으로는 상기 4-나선 다발 추가계 소속 사이토카인의 아미노산 중 110번째 내지 180번째 아미노산이 해당된다. 따라서 본 발명은 한 양태로서 상기 4-나선 다발 추가계 소속
15 사이토카인의 110번째 내지 180번째 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜 해당 수용체에 대하여 야생형 보다 높은 친화력으로 결합할 수 있는 4-나선 다발 추가계 사이토카인 변이체를 제공한다.

전술한 4-나선 다발 추가계 소속 사이토카인 중 인터페론(예, IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IFN- τ)의 결합 도메인은 “A-알파
20 나선”을 포함한다. 보다 구체적으로는 인터페론의 아미노산 중 1번째 내지 50번째 아미노산이 해당된다. 따라서 본 발명은 다른 양태로서 인터페론의 1번째 내지 50번째 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환시켜 인터페론 수용체에 대하여 야생형 인터페론보다 높은 친화력으로 결합할 수 있는 인터페론 변이체를 제공한다.

25 한편, 본 발명에 따라 변이되는 결합 도메인에는 둘 이상의 페닐알라닌이 포함되어 있을 수 있으며, 둘 이상의 페닐알라닌을 발린으로 치환할 수도 있지만, 이러한 경우에 단백질의 발현율이 급격히 떨어지기 때문에 하나의 페닐알라닌만을 발린으로 치환하는 것이 바람직하다. 이와

관련하여 본 발명자들은 소수성이 높은 영역에 존재하는 페닐알라닌이 발린으로 치환되는 경우에 생리활성 조절작용 단백질의 효능이 더욱 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에서는 본 발명에 따라 특정된 결합 도메인 내에서도 소수성이 높은 부분에 존재하는 페닐알라닌을 발린으로 치환하는 것이 바람직할 것이다. 단백질을 이루는 아미노산 서열 중 특정 부분의 소수성은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다(Kyte, J. et al. J. Mol. Biol. 1982, vol.157, pp.105-132, Hopp, T.P. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, vol.78(6), pp.3824-3828).

본 발명에 따른 생리활성 조절작용 단백질의 변이체는 생화학 분야의 당업자에게 일반적으로 널리 알려져 있는 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있다(Creighton, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., NY 1983). 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액상 또는 고상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다(Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

다른 방도로서, 본 발명에 따른 단백질 변이체는 유전공학적 방법에 의해 제조할 수 있다. 이러한 방법은 본 발명의 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 작제하는 과정을 포함한다. 이러한 DNA 서열은 야생형 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 변이시켜서 제조할 수 있다. 이를 간단하게 설명하면, 야생형 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 합성한 후, 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)에 의해 페닐알라닌에 대한 코돈을 발린에 대한 코돈으로 변화시킴으로써, 목적한 DNA 서열을 작제한다.

본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 작제하는 다른 방법은 화학 합성법일 것이다. 예를 들면, 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기를 사용하는 화학적 방법에 의해서 합성할 수 있다. 이와 같은 올리고뉴클레오타이드는 목적하는 단백질 변이체의 아미노산 서열을 기초로 하여, 그리고 바람직하게는 단백질 변이체가 생산되는

숙주세포에서 바람직한 코돈을 선택함으로써 만들어진다. 이와 관련해서, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy), 즉, 아미노산이 1개 이상의 코돈에 의해서 코딩될 수 있음은 익히 알려져 있다. 따라서, 특정 단백질 변이체를 코딩하는 다수의 축퇴성 DNA 서열이 존재할 것이며, 이들은 모두 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주된다.

본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열은 신호 서열을 코딩하는 DNA 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 이와 같은 신호 서열은, 존재하는 경우, 단백질 변이체의 발현을 위해서 선택된 숙주세포가 인식할 수 있는 것이어야 한다. 이는 또한 원핵세포 또는 진핵세포, 또는 이들의 조합일 수 있으며, 천연 단백질의 신호 서열일 수도 있다. 신호 서열의 포함 여부는 단백질 변이체를 생산하는 재조합 세포로부터 단백질 변이체를 분비시키는 것이 바람직한지에 따라 결정될 수 있다. 선택된 세포가 원핵세포인 경우, 일반적으로 DNA 서열이 신호 서열을 코딩하는 것이 아니라 직접 발현을 위해 N-말단 메티오닌을 포함하는 것이 바람직하다. 선택된 세포가 진핵세포인 경우, 일반적으로 신호 서열이 코딩되는 것이 바람직하고, 야생형 단백질 서열이 사용되는 것이 가장 바람직하다.

이렇게 제조된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어(operatively linked) 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키며, 생성된 형질전환체 또는 형질감염체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건하에서 배양하고, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 코딩된 실질적으로 순수한 생리활성 조절작용 단백질의 변이체를 회수한다.

본원 명세서에 사용된 용어 “벡터”는 외래 유전자를 숙주세포 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체로서의 DNA 분자를 말한다. 유용한 벡터가 되기 위해서는 복제될 수 있어야 하며, 숙주세포 내로 유입될 수 있어야 하고, 자신의 존재를 검출할 수 있는 수단을 구비하여야 한다. 또한 “재조합 발현

백터” 라는 용어는 일반적으로 외래 유전자가 숙주세포에서 발현될 수 있도록 백터에 작동가능하게 연결되어 형성된 환상의 DNA 분자를 말한다. 재조합 발현 백터는 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이중의 DNA가 생성될 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염된 유전자의 발현

5 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절 서열 및 해당 유전자를 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 백터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵 세포인 경우에는 발현 백터는 진핵 발현 숙주세포

10 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

상기 재조합 발현 백터와 연관되어 사용된 용어 “조절 서열 (expression control sequence)” 은 본 발명에 따른 단백질 변이체의 발현에 필수적이거나 이로인 해산 서열들을 말한다. 각각의 조절 서열은 단백질 변이체를 코딩하는 핵산 서열에 천연적(native) 혹은 외래적(foreign)일 수

15 있다. 그러한 조절 서열에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로펩타이드(propeptide) 서열, 프로모터, 인핸서 (enhancer) 혹은 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그널 펩타이드 서열 및 전사 종결인자 등을 포함한다. 최소한 조절 서열은 프로모터를 포함한다.

또 다른 용어 “작동가능하게 연결된(operably linked)” 은 한 핵산

20 서열이 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치된 상태를 의미한다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)가 성숙한 단백질의 분비에 참여함으로써 기능을 발휘했다면 그 단백질에 작동가능하게 연결된

25 것이다. 프로모터가 코딩 서열의 전사를 조절했다면 그 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 리보솜 결합 위치가 코딩 서열의 해독이 가능한 위치에 놓여져 있다면 그 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, “작동가능하게 연결된” 은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의

경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 적합한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고 뉴클레오타이드 어댑터 5 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

본 발명에 따른 단백질 변이체의 DNA 서열을 발현시키기 위해 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합이 이용될 수 있다. 진핵 숙주에 적합한 발현 벡터로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus), 시토메갈로 10 바이러스 및 레트로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열이 포함된다. 세균 숙주에 사용할 수 있는 발현 벡터에는 pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, pUC벡터, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체와 같이 이. 콜라이에서 유래된 세균성 플라스미드, RP4와 같이 보다 넓은 숙주 범위를 갖는 플라스미드, λ gt10과 λ gt11, NM989와 같은 매우 다양한 파지 람다(phage lambda) 15 유도체로 예시될 수 있는 파지 DNA 및 M13과 필라멘트성 단일가닥의 DNA 파지와 같은 기타 다른 DNA 파지가 포함된다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ 플라스미드 및 그의 유도체이다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941이다.

본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 발현시키기 20 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 이들 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절 서열에는 상술한 발현 벡터의 구조 유전자와 연관된 발현 조절 서열을 포함한다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 25 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스파타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵 세포 또는 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을

조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열, 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 $\Phi 10$ 은 이. 콜라이에서 폴리펩타이드를 발현시키는데 특히 유용하다.

상술한 재조합 발현 벡터에 의해 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포는
5 본 발명의 또 다른 측면을 구성한다. 본 발명의 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 발현시키는 데에는 매우 다양한 단핵세포성 숙주세포가 이용될 수 있다. 이들 숙주에는 이. 콜라이, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵 숙주들, 스포도프테라 프루기페르다 (SF9)와 같은 곤충 세포, CHO 및 마우스 세포와 같은 동물 세포, COS 1, COS 7,
10 BSC 1, BSC 40 및 BMT 10과 같은 아프리카 그린 원숭이 세포, 조직배양된 인간 세포 및 식물 세포들이 포함된다. 바람직한 숙주 생명체에는 이. 콜라이 및 바실러스 서브틸리스와 같은 세균, 그리고 조직배양된 포유동물 세포들이 포함된다.

전술한 형질전환 및 형질감염은 Davis et al., Basic Methods in
15 Molecular Biology, 1986 및 Sambrook et al., Basic Methods in Molecular Biology, 1989와 같은 기본적인 실험 지침서에 기술된 방법에 의해서 실시될 수 있다. 본 발명에 따른 단백질 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 벡터를 숙주세포로 도입하는데 바람직한 방법은 예를 들어서, 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium phosphate transfection), DEAE-덱스트란 매개
20 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 이환(transvection), 미세주입(microinjection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 스크래프 로딩(scrape loading), 총알식 도입(ballistic introduction) 또는 감염(infection) 등을 포함한다.

25 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의

범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 암호화된 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서도, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성 있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 또한 숙주를 선정함에 있어서도, 선택된 벡터와의 상용성, 뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 독성, 이들의 분비 특성, 폴리펩타이드를 올바르게 폴딩(folding)할 수 있는 능력, 발효 또는 배양 필요조건, 그리고 뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 정제 용이성 등을 고려하여야 한다.

본 발명에 따른 단백질 변이체의 제조 방법에서, 숙주세포들은 공지된 기술을 이용해서 폴리펩타이드의 생산에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 예를 들어, 세포들은 적당한 배지와 폴리펩타이드가 발현 및/혹은 분리되는 것을 허용하는 조건 하에, 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 혹은 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지된 기술을 사용해서 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적절한 영양배지에서 일어난다. 적당한 배지는 상업적인 공급자로부터 입수 가능하고 공지된 조성(예를 들면, American Type Culture Collection의 카탈로그)에 따라 제조될 수 있다. 폴리펩타이드가 영양배지로 직접 분비된다면 폴리펩타이드는 배지로부터 직접 분리될 수 있다. 폴리펩타이드가 분비되지 않는다면, 그것은 세포의 여액(lysate)으로부터 분리될 수 있다.

본 발명에 따른 생리활성 조절작용 단백질의 변이체는 당업계에 공지된 방법에 의해서 분리될 수 있다. 예를 들어, 단백질 변이체는 이로서 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발, 또는 침전을 포함하는 전통적인 방법에 의해서 영양 배지로부터 분리될 수 있다. 더 나아가 단백질 변이체는 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화성,

소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해도(예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 일반에 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

본 발명은 이러한 생리활성 조절작용 단백질의 변이체와 약제학적으로 허용되는 담체를 함유하는 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물에서 생리활성 조절작용 단백질의 변이체는 치료학적 유효량으로 포함되는 것이 바람직할 것이다.

본 발명의 약제학적 조성물에 사용되는 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 “약제학적으로 허용되는 담체” 라고 한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

본 발명의 약제학적 조성물은 목적하는 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물은 국부, 경구, 비경구, 안내, 경피, 직장, 장관 등으로 투여될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 본원에 사용된 용어 “비경구” 는 피하, 비내, 정맥내, 복강내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 심장내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구적 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액(Hank's

solution), 링거 용액(Ringer' s solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성성분의 현탁액은

5 적합한 유질의 주입 현탁액(oily injection suspension)으로 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수 양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고

10 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.

본 발명의 바람직한 약제학적 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의

15 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은

20 어떠한 비휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 그의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

앞서 제조된 액상 조성물은 박테리아 포획 필터 등을 통한 여과에 의해

25 살균제 또는 방사를 혼입시켜 대개 살균된다. 살균된 조성물은 예를 들면 동결건조에 의해 고형 조성물을 수득하여 고형화시킬 수 있으며, 사용시에 이를 무균수 또는 무균 희석액에 용해시킨다.

본 발명의 약제학적 조성물과 관련하여 사용되는 용어 “치료학적

유효량”은 본 발명의 조성물이 적용되는 질병에 대해 개선 또는 치료 효과를 나타내는 활성성분의 양을 의미한다. 본 발명의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량은 환자의 연령, 성별, 적용부위, 투여회수, 투여시간, 제형, 보조제의 종류 등에 따라 변할 수 있지만, 야생형보다 적은 양으로 투여하면 되는데
5 예를 들면 0.01~1000 $\mu\text{g/kg/일}$, 보다 바람직하게는 0.1~500 $\mu\text{g/kg/일}$, 가장 바람직하게는 1~100 $\mu\text{g/kg/일}$ 로 투여한다.

한편, 본 발명에 따른 조성물이 적용되는 질병은 단백질의 종류에 따라 다양함이 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명의 일실시에 해당하는 EPO 및 TPO의 경우에는 빈혈증 자체 뿐만 아니라 다른 질병으로 인한 합병증으로서
10 수반되는 빈혈증(예, anemia in inflammatory bowel disease, Progressive Kidney Disease, anemia of renal failure, the anemia associated with HIV infection in zidovudine (AZT) treated patients, anemia associated with cancer chemotherapy, Huntington's disease (HD), sickle cell anemia, Late Hyporegenerative Anemia in Neonates with Rh Hemolytic Disease after in
15 utero Exchange Transfusion)을 치료하는데 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 변이된 G-CSF는 호중구 감소증 자체 및 골수 이식 또는 암 화학요법 이후에 나타나는 호중구 감소증을 치료하는데 이용될 수 있으며, GH 변이체는 뇌하수체성 소인증 (pituitary dwarfism) 및 소아 만성 신부전 (paediatric chronic renal failure)을 치료하는데 이용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은
20 아니다.

이하, 본 발명은 4-나선 다발 초가계 소속 사이토카인, 구체적으로 CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β ,
25 IFN- γ , IFN- ω , IFN- τ 에 대하여 특정된 페닐알라닌을 발린으로 치환한 인터페론 변이체를 제공한다.

한 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 단백질 변이체를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째,

- 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체; (6) 야생형 GH의 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을

발린으로 치환한 IL-2 변이체; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로
 5 치환한 IL-4 변이체; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중
 10 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한
 15 LIF 변이체; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을
 20 발린으로 치환한 OSM 변이체; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째,
 25 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체.

다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 DNA를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (6) 야생형 GH의 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체를 코딩하는 DNA; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체를 코딩하는 DNA; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체를 코딩하는 DNA; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체를 코딩하는 DNA; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체를 코딩하는 DNA; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체를

코딩하는 DNA; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체를 코딩하는 DNA; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째,

97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA.

또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 재조합 발현 벡터를 제공한다: (1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (6) 야생형 GH의 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중

27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (16) 야생형

IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를

코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터.

또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 숙주세포를 제공한다:(1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (6) 야생형 GH의 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째,

47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 5 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체를 10 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 15 형질감염된 숙주세포; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 20 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 25 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환

또는 형질감염된 숙주세포; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에

- 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포;
- (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에
- 5 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포;
- (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는
- 10 형질감염된 숙주세포; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포.

- 또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 단백질 변이체
- 15 제조방법을 제공한다:(1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질
- 20 변이체의 제조방법; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (3) 야생형
- 25 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리

- 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된
- 5 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된
- 10 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (6) 야생형 GH의 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된
- 15 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체를 코딩하는
- 20 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게
- 25 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째,

- 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체를 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (13) 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는

형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에

5 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-5 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된

10 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에

15 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (18) 야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-

20 12p35 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에

25 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째

페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에
 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된
 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는
 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산
 5 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째,
 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째
 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체를 코딩하는 DNA가
 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된
 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는
 10 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (22) 야생형 OSM의 아미노산
 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는
 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에
 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된
 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는
 15 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; (23) 야생형 PL의 아미노산
 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째,
 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로
 치환한 PL 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현
 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고, 이 배양물로부터 상기
 20 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의
 제조방법; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째,
 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째,
 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체를
 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환
 25 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를
 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법; 및 (25) 야생형
 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째,
 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO

변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포를 배양하고 이 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리 정제하는 단계를 포함한 상기 단백질 변이체의 제조방법.

- 또 다른 부류의 특정 양태로서, 본 발명은 하기 약제학적 조성물을
- 5 제공한다:(1) 야생형 CNTF의 아미노산 서열(서열번호: 1)중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 CNTF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (2) 야생형 EPO의 아미노산 서열(서열번호: 2)중 서열번호: 2에 기재된 아미노산 서열 중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째
- 10 페닐알라닌을 발린으로 치환한 EPO 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (3) 야생형 Flt3L의 아미노산 서열(서열번호: 3)중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 Flt3L 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (4) 야생형 G-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 4)중 13번째, 83번째,
- 15 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 G-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (5) 야생형 GM-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 5)중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GM-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (6) 야생형 GH의
- 20 아미노산 서열(서열번호: 6)중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 GH 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (7) 야생형 IFN- α 2A의 아미노산 서열(서열번호: 7)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째,
- 25 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- α 2A 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (8) 야생형 IFN- α 2B의 아미노산 서열(서열번호: 8)중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을

- 발린으로 치환한 IFN- α 2B 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (9) 야생형 IFN- β 의 아미노산 서열(서열번호: 9)중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- β 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는
- 5 약제학적 조성물; (10) 야생형 IFN- γ 의 아미노산 서열(서열번호: 10)중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째, 95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- γ 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (11) 야생형 IFN- ω 의 아미노산 서열(서열번호: 11)중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는
- 10 153번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- ω 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (12) 야생형 IFN- τ 의 아미노산 서열(서열번호: 12)중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째, 159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IFN- τ 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (13)
- 15 야생형 IL-2의 아미노산 서열(서열번호: 13)중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-2 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (14) 야생형 IL-3의 아미노산 서열(서열번호: 14)중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-3 변이체 및 약제학적으로 허용되는
- 20 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (15) 야생형 IL-4의 아미노산 서열(서열번호: 15)중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-4 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (16) 야생형 IL-5의 아미노산 서열(서열번호: 16)중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한
- 25 IL-5 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (17) 야생형 IL-6의 아미노산 서열(서열번호: 17)중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-6 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (18)

야생형 IL-12p35의 아미노산 서열(서열번호: 18)중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 IL-12p35 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (19) 야생형 LPT의 아미노산 서열(서열번호: 19)중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LPT 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (20) 야생형 LIF의 아미노산 서열(서열번호: 20)중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 LIF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (21) 야생형 M-CSF의 아미노산 서열(서열번호: 21)중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 M-CSF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (22) 야생형 OSM의 아미노산 서열(서열번호: 22)중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 OSM 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (23) 야생형 PL의 아미노산 서열(서열번호: 23)중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 PL 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; (24) 야생형 SCF의 아미노산 서열(서열번호: 24)중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 SCF 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물; 및 (25) 야생형 TPO의 아미노산 서열(서열번호: 25)중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 TPO 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

이하, 실시예에서는 TPO, EPO, G-CSF, GH를 이용하여 본 발명이

이루고자 하는 생리활성 조절의 효능을 증대시키는 목적을 달성할 수 있음을 확인할 수 있었다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1. 야생형 TPO/EPO/G-CSF/GH를 코딩하는 DNA의 제조

10

A. 야생형 TPO

추출한 골수에 트라이졸 용액(TRIzol reagent, USA) 750 μ l를 첨가하여 골고루 섞이게 한 후, 핵단백질 복합체(nucleoprotein complex)가 완전히 분해될 때까지 약 5분간 실온에서 반응시켰다. 이 튜브에 200 μ l의 클로로포름을 넣고 15초간 잘 흔들어 준 후, 실온에서 2~3분간 더 반응시킨 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 최상층액을 새로운 1.5ml 튜브로 옮기고 500 μ l의 이소프로필 알코올을 첨가하여 잘 흔들어주고 영하 70 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시킨 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음 침전물을 75% 디이피씨-에탄올 (DEPC-ethanol)로 한차례 세척하고 4 $^{\circ}$ C에서 15,000rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음 실온에서 침전물을 너무 마르지 않게 조심하면서 5분간 말리고, RNA를 디이피씨-3차 증류수 50 μ l로 녹였다.

cDNA 합성은 상기 1.5ml 튜브에 정제된 2 μ g mRNA와 1 μ l 올리고 디티30 프라이머[oligo dT30 primer (10uM), Promega, USA]를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 2분간 가열한 후 얼음에 넣어 2분간 식혔다. 이 혼합물에 200U 엠-엠엘브이 역전사효소[M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)], 10 μ l 5배 반응완충용액[reaction buffer 250mM 트리스-에이치씨엘 (Tris-HCl), pH 8.3, 375mM 염화칼륨 (KCl), 15mM 염화마그네슘 (MgCl₂), 50mM 디티티 (DTT)], 1 μ l

다엔티피[dNTP (각각 10mM의 농도, Takara, Japan)]를 넣고 디이피씨 [DEPC (Sigma, USA)]를 처리한 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켜 1차 cDNA를 합성하였다.

상기에서 얻어진 1차 cDNA를 주형으로 하고, 프라이머로는 서열번호:
5 26에 해당하는 프라이머 1과 서열번호 27에 해당하는 프라이머 2를 이용하는
중합효소 연쇄반응으로 사람의 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 제조하였다.
중합효소 연쇄반응은 3 μ l 1차 cDNA, 2U 피에프유 DNA 폴리머라제[pfu DNA
polymerase (Stratagene, USA)], 10 μ l 10배 반응완충용액, 1% 트리톤 엑스-
100(Triton X-100), 1mg/ml 우혈청알부민(BSA), 3 μ l 프라이머1 (10 μ M), 3 μ l
10 프라이머2 (10 μ M), 2 μ l 다엔티피(dNTP, 각각 10 mM)를 넣고 3차 증류수로
100 μ l가 되도록 첨가한 후 실시하였다. 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한
다음 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 52 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초씩 30회 반응시키고,
72 $^{\circ}$ C에서 10분간 더 반응시켜 중합효소 연쇄반응 산물이 완전한 평활
말단(blunt end)이 되도록 하였다.

15 상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 젤[agarose gel (BMA,
USA)]에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트[Qiaex II gel extraction
kit (Qiagen, USA)]를 이용하여 순수 분리하였다. 15U *Eco*RI (Takara,
Japan)과 10U *Not* I (Takara, Japan), 3 μ l 10배 반응완충용액을 섞은 후, 3차
증류수로 30 μ l가 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 반응물을
20 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트로 순수
분리하였다.

벡터로 사용할 5 μ g 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript
KSII(+) (Stratagene, USA)]를 15U *Eco*RI과 10U *Not* I, 3 μ l 10배
반응완충용액을 섞은 후, 3차 증류수로 30 μ l가 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서
25 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스
투 젤 추출 키트로 순수 분리하였다.

이렇게 제조된 벡터 100ng에 앞서 제한효소로 처리된 중합효소
연쇄반응 산물 20ng을 넣고 0.5U 티포 DNA 리가아제[T4 DNA ligase (Amersham,

USA)], 1 μ l 10배 반응완충용액을 넣은 후 3차 증류수로 10 μ l가 되도록 첨가한 후 16 $^{\circ}$ C 수조(water bath)에서 16시간 동안 반응시켜서, 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다. 대장균[*E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)]을 루비듐 클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션시켜
5 암피실린[ampicillin (Sigma, USA)]을 50 μ g/ml 함유한 엘비 한천 평판배지(LB medium)에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양하였다. 생성된 콜로니들을 암피실린이 50 μ g/ml 함유된 엘비 액체 배양액(LB broth) 3ml에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 진탕 배양하였다. 이 중 1ml을 알카라인 분해(alkaline
10 lysis)법으로 플라스미드 미니-프레퍼레이션(plasmid mini-preparation)한 후 *Eco*RI과 *Not* I 으로 절단하여 클로닝의 유무를 확인하였다.

B. 야생형 EPO를 코딩하는 DNA의 제조

야생형 EPO를 코딩하는 DNA는 전술한 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를
15 제조하는 과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다.

골수에서 추출한 mRNA를 주형으로 하는 역전사-중합효소 연쇄반응으로 제조된 1차 cDNA를 주형으로 하고, 프라이머로는 서열번호 32에 해당하는 프라이머 11과 서열번호 33에 해당하는 프라이머 12를 이용하는 중합효소 연쇄반응으로 사람의 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 제조하였다. 상기
20 중합효소 연쇄반응 산물을 제한효소 *Eco*RI과 *Bam*HI 로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (*Stratagene*, USA)의 *Eco*RI/*Bam*HI 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 대장균 [*E. coli* Top10 (*Invitrogen*, USA)]을 루비듐 클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 상기 재조합 벡터로
25 트랜스펙션시켜 이를 배양하였다. 이로부터 수득한 배양물 1ml을 알카라인 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드 미니-프레퍼레이션 (plasmid mini-preparation)한 후 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 절단하여 클로닝의 유무를 확인하였다.

C. 야생형 G-CSF

야생형 G-CSF를 코딩하는 DNA는 전술한 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 제조하는 과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다.

건강인 혈액의 백혈구에서 추출한 mRNA 를 주형으로 하는 역전사-
5 중합효소 연쇄반응으로 제조된 1 차 cDNA 를 주형으로 하고, 프라이머로는
서열번호 38 에 해당하는 프라이머 21 과 서열번호 39 에 해당하는 프라이머
22 를 이용하는 중합효소 연쇄반응으로 사람의 야생형 G-CSF 를 코딩하는
DNA 를 제조하였다. 상기 중합효소 연쇄반응 산물을 제한효소 *Sma* I 과 *EcoR* I
10 으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터 피블루스크립트 케이에스투(+)
[pBluescript KSII(+)] (Stratagene, USA)의 *Sma* I/*EcoR* I 부위에 삽입하여
클로닝하였다. 대장균 [*E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)]을 루비듐
클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든
후 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션시켜 이를 배양하였다. 이로부터 수득한
15 배양물 1 ml을 알카라인 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드 미니-
프레퍼레이션 (plasmid mini-preparation)한 후 *Sma* I 과 *EcoR* I 으로 절단하여
클로닝의 유무를 확인하였다.

D. 야생형 GH

야생형 GH를 코딩하는 DNA는 전술한 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를
20 제조하는 과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다.

야생형 GH 는 ATCC 에서 구입하였다(ATCC No. 67097). 리더 서열을
추가하기 위해 이 DNA 를 주형으로 프라이머 35(서열번호: 46)와
프라이머 36(T3)을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시한 다음 이로부터
수득한 산물을 주형으로 프라이머 37(서열번호: 47)과 프라이머 38(T3)을
25 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시해서 리더 서열이 첨가된 야생형 GH 를
코딩하는 DNA 를 제조하였다. 상기 중합효소 연쇄반응 산물을 제한효소 *EcoR*
I 과 *Hind* III 로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝 벡터 피블루스크립트
케이에스투(+)[pBluescript KSII(+)] (Stratagene, USA)의 *EcoR* I/*Hind* III

부위에 삽입하여 클로닝하였다. 대장균 [*E. coli* Top10 (Invitrogen, USA)]을 루비듐 클로라이드(rubidium chloride)법으로 컴피턴트 세포(competent cell)를 만든 후 상기 재조합 벡터로 트랜스펙션시켜 이를 배양하였다. 이로부터 수득한 배양물 1 ml을 알카라인 분해(alkaline lysis)법으로 플라스미드 미니-프레퍼레이션 (plasmid mini-preparation)한 후 *EcoR* I 과 *Hind* III 로 절단하여 클로닝의 유무를 확인하였다.

실시예 2. 본 발명에 따른 TPO/EPO/G-CSF/GH 변이체를 코딩하는 DNA의 제조

A. TPO 변이체

TPO의 D-알파 나선에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(TPO-[F46V], TPO-[F128V], TPO-[F131V] 및 TPO-[F141V])를 제조하였다.

<표 1>

야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하는데 이용된 프라이머

프라이머번호			핵산서열	서열번호
1	야생형 TPO	센스	5'-CGGAATTCGATGAGCTGACTGAATTG-3'	26
2		안티센스	5'-TTTAGCGGCCGATTCTTACCCCTCCTGAG-3'	27
3	TPO-[F46V]	센스	T3	
4		안티센스	5'-CCAAGCTAACGTCCACAGCAG-3'	28
5	TPO-[F128V]	센스	T3	
6		안티센스	5'-GCTCAGGACGATGGCAT-3'	29
7	TPO-[F131V]	센스	T3	
8		안티센스	5'-GGTGTGGACGCTCAGGAAGATG-3'	30
9	TPO-[F141V]	센스	T3	
10		안티센스	5'-CATCAGGACAGCACCTTTCC-3'	31

TPO-[F46V]/TPO-[F128V]/TPO-[F131V]/TPO-[F141V]를 코딩하는 DNA를

제조하기 위해서 실시예 1의 A에서 얻어진 피블루스크립트·케이에스 투(+)에 클로닝된 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 상기 표 1에 특정된 1 μ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 μ l T3(10 pmole)을 가지고 1차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응 조건은 2.5U Ex Taq(Takara, Japan),

5 5 μ l 10배 반응완충용액, 1mM 염화마그네슘, 4 μ l 디앤티피(각 2.5mM)를 넣고 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 다음 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 반응시킨 후 중합효소 연쇄반응 산물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하여 메가 프라이머를
10 제조하였다. 이렇게 제조된 메가 프라이머와 벡터 프라이머인 1 μ l T7(10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이에스 투(+)에 클로닝된 야생형 TPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 2.5U Ex Taq (Takara, Japan), 5 μ l 10배 반응완충용액, 4 μ l 디앤티피 (각 2.5mM)를 넣고 3차 증류수로 50 μ l가 되도록 첨가한 후 2차 중합효소 연쇄반응을 실시하는데, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 다음
15 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30회 반응시키고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 더 반응시켰다.

여기서, 본 발명에 따른 TPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조를 위한 1차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서 마그네슘의 농도를 1mM로 하였고, 어닐링 온도 60 $^{\circ}$ C에서 TPO-[F46V]는 약 280bp, TPO-
20 [F128V]는 약 520bp, TPO-[F131V]는 약 530bp, TPO-[F141V]는 약 560bp의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가 프라이머는 각각 TPO-[F46V]는 4 μ l, TPO-[F128V]는 2 μ l, TPO-[F131V]는 2 μ l, TPO-[F141V]는 2 μ l을 넣고 어닐링 온도는 58 $^{\circ}$ C에서 실험을 수행한 결과 1062bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로
25 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *EcoRI*과 10U *NotI*, 3 μ l 10배 반응완충용액, 3 μ l 0.1% 우혈청알부민을 섞은 후, 3차 증류수로

30 μ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 라이게이션 (ligation)하였다. 이렇게 생산된 재조합 발현 벡터 중에서 TPO-[F141V]를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터는 Tefficacin4로 명명되었고 부다페스트 협약하에 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2003년 6월 9일자로 기탁번호 KCCM-10500으로 국제기탁되었다.

B. EPO 변이체

EPO의 결합 도메인내에 있는 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체 (EPO-[F48V], EPO-[F138V], EPO-[F142V] 및 EPO-[F148V])를 제조하였다.

<표 2>

야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체를 코딩하는 DNA를 제조하는데 이용된 프라이머

프라이머번호			핵산서열	서열번호
11	야생형 EPO	센스	5'-GGCGCGGAGATGGGGGT-3'	32
12		안티센스	5'-TGGTCATCTGTCCCCTGTCCTG-3'	33
13	EPO-[F48V]	센스	T3	
14		안티센스	5'-GACATTAACCTTTGGTGTCTGGGAC-3'	34
15	EPO-[F138V]	센스	5'-CTGTCCGCAAACCTCTCCGAG-3'	35
16		안티센스	T7	
17	EPO-[F142V]	센스	5'-CGCAAACCTCGTCCGAGTCTACT-3'	36
18		안티센스	T7	
19	EPO-[F148V]	센스	5'-GAGTCTACTCCAATGTGGTGGG-3'	37
20		안티센스	T7	

본 발명에 따른 EPO 변이체를 코딩하는 DNA는 전술한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다. EPO-[F48V]/EPO-

[F138V]/EPO-[F142V]/ EPO-[F148V]를 코딩하는 DNA를 제조하기 위해서 실시예 1의 B에서 얻어진 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 상기 표 2에 특정된 1 μ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 μ l T3(10 pmole)을 가지고 1차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

5 이로부터 제조된 메가 프라이머와 벡터 프라이머인 1 μ l T7(10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 EPO를 코딩하는 DNA를 주형으로 2차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

여기서, 본 발명에 따라 변이된 EPO 변이체를 코딩하는 DNA의 제조를 위한 1차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서

10 마그네슘의 농도를 1mM로 하였고, 어닐링 온도 60 $^{\circ}$ C에서 EPO-[F48V]는 약 300 bp, EPO-[F138V]는 약 550bp, EPO-[F142V]는 약 550bp, EPO-[F148V]는 약 550bp의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가 프라이머는 각각 EPO-[F48V]는 약 1 μ l, EPO-[F138V]는 1 μ l, EPO-[F142V]는 약 1 μ l, EPO-[F148V] 약 1 μ l를 넣고 어닐링 온도는 58 $^{\circ}$ C에서 실험을

15 수행한 결과 580bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *EcoRI*과 10U *BamHI*,

20 3 μ l 10배 반응완충용액, 3 μ l 0.1% 우혈청알부민을 섞은 후, 3차 증류수로 30 μ l가 되도록 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 라이게이션 (ligation) 하였다. 이렇게 생산된 재조합 발현 벡터 중에서 EPO-[F148V]를 코딩하는

25 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터는 Refficacin4로 명명되었고 부다페스트 협약하에 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2003년 6월 9일자로 기탁번호 KCCM-10501로 국제기탁되었다.

C. G-CSF 변이체

G-CSF 의 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(G-CSF[F13V], G-CSF[F83V], G-CSF[F113V], G-CSF[F140V], G-CSF[F144V], G-CSF[F160V])를 제조하였다.

5

<표 3>

야생형 G-CSF 및 본 발명에 따른 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA 를 제조하는데 이용된 프라이머

프라이머번호			핵산서열	서열번호
21	야생형 G-CSF	센스	5'-CCCCGGGACCATGGCTGGACCTGCCACCCAG-3'	38
22		안티센스	5'-CGAATTCGCTCAGGGCTGGGCAAGGAG-3'	39
23	G-CSF-[F13V]	센스	T7	
24		안티센스	5'-ACTTGAGCAGGACGCTCT-3'	40
25	G-CSF-[F83V]	센스	5'-AGCGGCCTTGTCCTCTA-3'	41
26		안티센스	T3	
27	G-CSF-[F113V]	센스	5'-GACGTTGCCACCACCAT-3'	42
28		안티센스	T3	
29	G-CSF-[F140V]	센스	5'-GCCGTCGCCTCTGCTTT-3'	43
30		안티센스	T3	
31	G-CSF-[F144V]	센스	5'-TCGCCTTCTGCTGTCCAG-3'	44
32		안티센스	T3	
33	G-CSF-[F160V]	센스	5'-TCTGCAAGACGTCCTGG-3'	45
34		안티센스	T3	

10 본 발명에 따른 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA 는 전술한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA 의 제조과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다. G-CSF-[F13V]/G-CSF-[F83V]/G-CSF-[F113V]/G-CSF-[F140V]/G-CSF-[F144V]/G-CSF-[F160V]를
 코딩하는 DNA 를 제조하기 위해서 실시예 1 의 C 에서 얻어진 피블루스크립트
 케이에스 투(+)에 클로닝된 야생형 G-CSF 를 코딩하는 DNA 를 주형으로 상기 표
 15 3 에 특정된 1 μ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 μ l T3(10 pmole)을
 가지고 1 차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이로부터 제조된 메가

프라이머와 벡터 프라이머인 1 μ l T7 (10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이스 투(+)에 클로닝된 야생형 G-CSF 를 코딩하는 DNA 를 주형으로 2 차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

여기서, 본 발명에 따라 변이된 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA 의 제조를
5 위한 1 차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서 마그네슘의 농도를 1mM 로 하였고, 어닐링 온도 60℃에서 G-CSF-[F13V]는 약 600bp, G-CSF-[F83V]는 약 390bp, G-CSF-[F113V]는 약 300bp, G-CSF-[F140V]는 약 200bp, G-CSF-[F144V]는 약 200bp, G-CSF-[F160V]는 약 150bp 의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2 차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가
10 프라이머는 각각 약 1 μ l 넣고 어닐링 온도는 58℃에서 실험을 수행한 결과 640bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후,
15 큐어엑스 투 겔 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *Sma* I 과 10U *EcoR* I, 3 μ l 10 배 반응완충용액, 3 μ l 0.1% 우혈청알부민을 섞은 후, 3 차 증류수로 30 μ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2 시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 겔에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 겔 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이스 투(+)에 라이게이션
20 (ligation)하였다. 이렇게 생산된 재조합 발현 벡터 중에서 G-CSF-[F140V]를 코딩하는 DNA 가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터는 Greffiacin4 로 명명되었고 부다페스트 협약하에 KCCM(Korean Culture Center of Microorganisms)에 2004 년 5 월 17 일자로 기탁번호 KCCM-10571 로 국제기탁되었다.

25

D. GH 변이체

GHR 의 페닐알라닌을 발린으로 치환한 변이체(GH-[F44V], GH-[F97V], GH-[F139V], GH-[F146V], GH-[F166V], GH-[F176V])를 제조하였다.

<표 4>

야생형 GH 및 본 발명에 따른 GH 변이체를 코딩하는 DNA 를 제조하는데 이용된 프라이머

5

프라이머번호			핵산서열	서열번호
35	리더서열첨가	센스-1	5'-CTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGGCTTCAA GAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCTTATC-3'	46
36		안티센스	T3	
37	야생형 GH	센스-2	5'-GGAATTCATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCC CTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCT-3'	47
38		안티센스	T3	
39	GH-[F44V]	센스	T7	
40		안티센스	5'-GGGGTTCTGCAGGACTGAATACTTC-3'	48
41	GH-[F97V]	센스	T7	
42		안티센스	5'-GGCTGTGGCGACGATCCTG-3'	49
43	GH-[F139V]	센스	T7	
44		안티센스	5'-GTAGGTCTGCTTGACGATCTGCCCAG-3'	50
45	GH-[F146V]	센스	T7	
46		안티센스	5'-GAGTTTGTGTCGACCTTGCTGTAG-3'	51
47	GH-[F166V]	센스	T7	
48		안티센스	5'-GTCCTTCTGACGCAGTAGAGCAG-3'	52
49	GH-[F176V]	센스	T7	
50		안티센스	5'-CGATGCGCAGGACTGTCTCGACCTTGTC-3'	53

본 발명에 따른 GH 변이체를 코딩하는 DNA 는 전술한 TPO 변이체를 코딩하는 DNA 의 제조과정과 동일한 절차에 따라 제조하였다. GH-[F44V], GH-

[F97V], GH-[F139V], GH-[F146V], GH-[F166V], GH-[F176V]를 코딩하는 DNA 를 제조하기 위해서 실시예 1 의 D 에서 얻어진 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 GH 를 코딩하는 DNA 를 주형으로 상기 표 4 에 특정된 1 μ l 프라이머(10 pmole)와 벡터 프라이머인 1 μ l T7(10 pmole)을 가지고 1 차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이로부터 제조된 메가 프라이머와 벡터 프라이머인 1 μ l T3(10 pmole)을 가지고 다시 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 클로닝된 야생형 GH 를 코딩하는 DNA 를 주형으로 2 차 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

여기서, 본 발명에 따라 변이된 GH 변이체를 코딩하는 DNA 의 제조를 위한 1 차 중합효소 연쇄반응에서는 핵산 합성 오류를 최소화하기 위해서 마그네슘의 농도를 1mM 로 하였고, 어닐링 온도 60℃에서 GH-[F44V]는 약 130bp, GH-[F97V]는 약 300bp, GH-[F139V]는 약 420bp, GH-[F146V]는 약 450bp, GH-[F166V]는 약 500bp, GH-[F176V]는 약 530bp 의 메가 프라이머를 확인할 수 있었다. 2 차 중합효소 연쇄반응에서 사용한 메가 프라이머는 각각 약 1 μ l 넣고 어닐링 온도는 58℃에서 실험을 수행한 결과 650bp 가량의 밴드가 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 또한 염기 서열 분석으로 원하는 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환되었음을 확인할 수 있었다.

상기 중합효소 연쇄반응 산물은 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트를 이용하여 순수 분리하고 15U *EcoR* I 과 10U *Hind* III, 3 μ l 10 배 반응완충용액, 3 μ l 0.1% 우혈청알부민을 섞은 후, 3 차 증류수로 30 μ l가 되도록 첨가한 후 37℃에서 2 시간 반응시켰다. 반응물을 0.8% 아가로스 젤에 전기 영동한 후, 큐어엑스 투 젤 추출 키트로 순수 분리하고 전술된 방법에 따라 피블루스크립트 케이애스 투(+)에 라이게이션 (ligation)하였다.

25

실시예 3. 본 발명에 따른 변이체의 발현 및 정제

A. TPO 변이체

a. 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용한 형질전환체의 제조

35mm 디쉬에 햄스터 난소 세포를 디쉬당 1.5×10^5 개로 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum)을 함유한 디엠이엠 배지[DMEM medium (Gibco BRL, USA)]를 이용하여 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 18~24시간 배양하였다. 12×5mm 멸균 튜브에, 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 μ l에 실시예 2의 A에서 제조된 TPO 변이체를 코딩하는 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터 1.5 μ g을 첨가한 용액과 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 100 μ l에 리포펙타민 용액(Invitrogen, USA) 6 μ l를 첨가한 용액을 혼합한 후 DNA-양이온 지질 용액 복합체 형성을 위해 45분 동안 실온에서 방치하였다. 앞서, 35mm 디쉬에서 배양한 햄스터 난소 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 다음 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지 800 μ l를 첨가하고, DNA-양이온 지질 용액 복합체를 조심스럽게 뿌려주었다. 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 5시간 배양 후 20% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 1ml을 첨가하였다. 다시 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 18~24시간 배양한 후 세포를 우태아혈청을 함유하지 않은 디엠이엠 배지로 2회 씻은 후 10% 우태아혈청을 함유한 디엠이엠 배지 2ml 첨가한 후 5% 이산화탄소, 37°C 배양기에서 72시간 배양하였다.

20

b. ELISA 방법을 이용한 TPO 변이체의 발현 양상 분석

앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체에서 TPO 변이체의 발현여부를 확인하기 위하여 효소 면역 검사법(ELISA)를 실시하였다. 96 웰 플레이트 [96 well plate (Falcon, USA)]에 고트 안티-휴먼 TPO 폴리클로날 항체[Goat anti-human TPO Polyclonal antibody (R&D, USA)]를 코팅용액 (0.1M Sodium bicarbonate, [pH 9.6))을 사용하여 10 μ g/ml이 되게 희석하여 100 μ l씩 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액 (0.1% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로 3회 세척한 후 블로킹용액 (1%

우혈청알부민, 5% 자당, 0.05% 소듐 아자이드)을 200 μ l 분주하여 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 세척용액으로 3회 세척하였다. 배양물 중 상층액(양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 포함)을 희석용액(0.1% 우혈청알부민, 0.05% 트윈-20 함유 1배 인산완충용액)으로

5 연속적으로 희석하였고 양성 대조군으로 25ng/ml 재조합 사람의 TPO (Calbiochem, USA)를, 음성 대조군으로 트랜스펙션하지 않은 햄스터 난소 세포의 배양액을 사용하여 동일하게 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액으로 3회 세척 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 TPO 항체 [Biotinylated goat anti-human TPO antibody (R&D, USA)]를

10 희석용액을 사용하여 0.2ug/ml이 되도록 희석한 후 이를 100 μ l씩 분주하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 용액으로 3회 세척하고 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP (R&D, USA)]를 희석용액으로 1:200 희석한 다음 100 μ l씩 분주하고 실온에 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척용액으로 3회 세척한 후 티엠비 마이크로웰 퍼옥시다아제 서브스트레이트 시스템 [TMB

15 microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)]을 이용하여 발색시키고, 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 630nm에 대한 흡광도를 측정하여 발현 여부를 확인하였다.

c. 웨스턴 블로팅을 이용한 TPO 변이체의 발현양상 및 분자량 분석

20 앞서 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법으로 제조된 형질전환체를 우태아 혈청을 제거하기 위해 초-에스-에스에프엠 투[CHO-S-SFM II (Gibco BRL, USA)]에서 배양한 후 배양액을 모아 0.20 μ m의 실린지 필터를 사용하여 세포 찌꺼기들을 제거하고 cut off가 30,000MW인 센트리콘[centricon (Millipore, USA)]을 사용하여 농축시켰다. 5% 베타-메르캅토에탄올(β -mercaptoethanol)

25 함유 5배 로딩 버퍼를 첨가한 후 10분간 끓인 다음 환원상태 에스디에스-페이지(reduced SDS-PAGE)를 실시하였다. 스택킹 젤(Stacking gel)은 3.5% 아크릴아마이드 겔[acrylamide gel (0.5M 트리스-에이치씨엘 [pH 6.8), 0.4% 에스디에스]]을 사용하였으며, 러닝 젤(running gel)은 10% 아크릴아마이드

겔(1.5M 트리스-에이치씨엘 pH 8.8, 0.4% 에스디에스)을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 구멍 크기가 0.4 μ m인 웨스트란[Westran (PVDF transfermembrane, S&S)]에 350mA로 2시간 동안 전기 전이시켰고, 이 때 25mM 트리스-192mM 글리신 (pH 8.3)-20% 메탄올을 완충용액으로
5 사용하였다. 막 전이 후 5% 탈지분유로 10분씩 3회 블로킹을 실시하였다. 이 후 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 TPO 항체 [biotinylated goat anti-human TPO antibody (R&D, USA)]를 블로킹 용액으로 0.25 μ g/ml이 되게 희석하고 이를 3ml 넣은 후 잘 흔들어 주면서 실온에서 6시간 반응시켰다. 세척용액으로 3회 세척한 후 스트렙타비딘-에이치알피 [Streptavidin-HRP
10 (serotec, USA)]를 블로킹용액으로 1:100이 되도록 희석한 다음 1시간 반응시키고 세척용액으로 3회 세척한 후 디에이비 서브스트레이트 키트 [DAB substrate kit (VECTOR LABORATORIES)]를 사용하여 제품 사용법에 준하는 방법으로 발색제를 만들었고, 이를 3ml 첨가한 후 실온에서 10분간 발색시켰다. 반응의 종료는 3차 증류수로 하였으며, 결과는 도 2a에 나타내었다.

15 도 2a에서 알 수 있는 바와 같이 야생형 TPO 와 본 발명에 따른 TPO 변이체는 모두 동일한 분자량(약 55kD)으로 발현되었다.

도 3a 는 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체들간의 발현정도를 상대적으로 나타낸 그래프이다. 야생형의 발현양을 기준으로 TPO-[F128V] 변이체만이 발현정도가 약 1.4 배 정도로 높게 나왔으며, TPO-[F46V] 변이체는
20 약 20%, TPO-[F131V] 변이체 및 TPO-[F141V] 변이체는 약 40%로 발현정도가 낮았다.

B. EPO 변이체

실시에 2의 B에서 수득한 EPO 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는
25 재조합 발현 벡터를 이용하여 전술한 TPO의 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법과 동일한 절차를 실행하여 형질전환체를 제조하였다.

상기 형질전환체를 배양한 다음 ELISA 방법을 이용하여 EPO 변이체의 발현 여부를 확인하였으며, 웨스턴 블로팅으로 EPO 변이체의 발현양상 및

분자량을 분석하고 이의 결과는 도 2b에 나타내었다.

도 2b에서 알 수 있는 바와 같이 야생형 EPO와 본 발명의 EPO 변이체는 모두 동일한 분자량(약 45kD)으로 발현되었다.

5 도 3b 는 야생형 EPO 및 본 발명에 따른 EPO 변이체들간의 발현정도를 상대적으로 나타낸 그래프이다. 야생형의 단백질 발현양을 기준으로 EPO-[F48V] 변이체는 약 1.4 배의 발현정도를 EPO-[F138V] 변이체는 약 1.2 배의 발현정도를 보이는 반면, EPO-[F142V] 변이체 및 EPO-[F148V] 변이체는 야생형의 20%로 발현정도가 낮았다.

10 C. G-CSF 변이체

실시에 2의 C에서 수득한 G-CSF 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 이용하여 전술한 TPO의 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법과 동일한 절차를 실행하여 형질전환체를 제조하였다.

15 상기 형질전환체를 배양한 다음 ELISA 방법을 이용하여 G-CSF 변이체의 발현 여부를 확인하였으며, 웨스턴 블로팅으로 G-CSF 변이체의 발현양상 및 분자량 분석하고 이의 결과는 도 2c에 나타내었다.

도 2c에서 알 수 있는 바와 같이 야생형 G-CSF와 본 발명의 G-CSF 변이체는 모두 동일한 분자량(약 50kD)으로 발현되었다.

20 도 3c 는 야생형 G-CSF 및 본 발명에 따른 G-CSF 변이체들간의 발현정도를 상대적으로 나타낸 그래프이다. 야생형의 단백질 발현양을 기준으로 G-CSF-[F13V], G-CSF-[F113V] 및 G-CSF-[F160V] 변이체들은 비슷한 수준의 단백질 발현정도를 보였으며, G-CSF-[F83V] 변이체는 약 1.9 배 정도로 발현정도가 높았다. 반면에, G-CSF-[F140V] 변이체는 야생형 단백질 발현양의 약 50%, G-CSF-[F144V] 변이체는 약 70%로 단백질 발현정도가 낮았다.

25

D. GH 변이체

실시에 2의 d에서 수득한 GH 변이체를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는

재조합 발현 벡터를 이용하여 전술한 TPO의 양이온 지질-매개 트랜스펙션 방법과 동일한 절차를 실행하여 형질전환체를 제조하였으며 이를 배양하여 GH 변이체를 발현하였다.

5 실시예 4. EPO/TPO/G-CSF/GH 수용체를 코딩하는 DNA의 제조

A. EPO 수용체 또는 TPO 수용체를 코딩하는 DNA의 제조

EPO 변이체 또는 TPO 변이체의 해당 수용체에 대한 결합 친화력을 측정하기 위해서 각각의 수용체(이하, EPO 수용체 또는 TPO 수용체)를
10 제조하였는데, 수용체의 카르복시기 말단에 사람의 IgG1 Fc 부분을 붙여 재조합 발현 벡터를 제조하였다. 먼저 제한효소 EcoRI의 인식서열과 리더 서열의 코딩 서열을 갖는 한 프라이머(EPO 수용체의 경우: 프라이머 51, TPO 수용체의 경우: 프라이머 53)와 3' 말단서열과 면역글로불린 G1(IgG1)의
15 힌지부위(hinge region: H)의 5' 말단의 일부 서열을 코딩하는 안티센스 서열(EPO 수용체의 경우: 프라이머 52, TPO 수용체의 경우: 프라이머 54)을 갖는 다른 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 EPO 수용체 또는 TPO 수용체를 코딩하는 DNA 단편을 생성하였다.

이 DNA 단편과 면역글로불린 G1의 Fc 부위를 코딩하는 DNA 단편을 한 시험관에 혼합한 후, 공통되는 서열사이에서 상보적 결합이 일어나도록
20 유도하였다. 이를 주형으로 EPO 수용체 또는 TPO 수용체의 5' 말단을 코딩하는 서열을 갖는 프라이머(EPO 수용체의 경우: 프라이머 51, TPO 수용체의 경우: 프라이머 53)와 IgG1 Fc의 3' 말단을 코딩하는 프라이머(프라이머 55)를 사용한 중합효소 연쇄반응을 일으켜, 상기 EPO 수용체 또는 TPO 수용체와 IgG1 Fc 부위의 DNA 단편의 서열을 포함하는 DNA 작제물을
25 증폭시켰다. 이를 제한효소 EcoRI과 HindIII를 이용하여 절단한후 피씨알-3 발현벡터에 삽입하여 클로닝하였다.

<표 5>

EPO 수용체 및 TPO 수용체의 제조에 이용된 프라이머 서열

	프라이머 번호		핵산 서열	서열 번호
EPO 수용체	51	센스	5'-CGGAATTCATGGACCACCTCGGGGCG-3'	54
	52	안티센스	5'-GCTCTAGACTAAGAGCAAGCCACATAGCTGGG-3'	55
TPO 수용체	53	센스	5'-CCCAAGCTTATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTC-3'	56
	54	안티센스	5'-GGAATTCTTACCCCTCCTGAGACAGATTCTGG-3'	57
IgG1-R- XbaI	55		5'-GCTCTAGAGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'	58

B. G-CSF 수용체 또는 GH 수용체를 코딩하는 DNA 의 제조

- 5 G-CSF 또는 GH 변이체의 해당 수용체에 대한 결합 친화력을 측정하기
위해서 각각의 수용체(이하, G-CSF 수용체 또는 GH 수용체)를 제조하였는데,
수용체의 카르복시기 말단에 사람의 IgG1 Fc 부분을 붙여 재조합 발현 벡터를
제조하였다. G-CSF 수용체는 제한효소 *Hind* III 의 인식서열과 리더 서열의
코딩 서열을 갖는 프라이머(프라이머 56)와 제한효소 *EcoR* I 의 인식서열과
10 3' 말단서열을 갖는 프라이머(프라이머 57), GH 수용체는 제한효소 *EcoRI* 의
인식서열과 리더 서열의 코딩 서열을 갖는 한 프라이머(프라이머 58)와
제한효소 *Spe* I 의 인식서열과 3' 말단서열을 갖는 프라이머(프라이머 59)를
이용하여 중합효소 연쇄반응으로 G-CSF 와 GH 수용체의 세포외부분
(extracellular domain)을 제조하였다. 상기 중합효소 연쇄반응 산물을 G-
15 CSF 는 제한효소 *Hind* III 와 *EcoR* I 으로 소화시키고, 시판되고 있는 클로닝
벡터 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (Stratagene,
USA)]의 *Hind* III/*EcoR* I 부위에 삽입하여 클로닝하였다. GH 는 상기 중합효소
연쇄반응 산물을 제한효소 *EcoR* I 과 *Spe* I 으로 소화시키고, 시판되고 있는
클로닝 벡터 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (Stratagene,
20 USA)]의 *EcoR* I/*Spe* I 부위에 삽입하여 클로닝하였다.

이 DNA 를 면역글로불린 G1(IgG1)의 힌지부위(hinge region: H)의 5'
말단의 일부 서열을 코딩하는 센스 서열(G-CSF 수용체의 경우: 프라이머 60,

GH 수용체의 경우: 프라이머 61)을 갖는 프라이머와 프라이머 62 를 사용하여 중합효소 연쇄반응으로 사람의 IgG1 Fc 부분을 제조하였다. 이 단편을 제한효소 (G-CSF 의 경우 - *EcoR* I 과 *Xba* I 으로 소화시키고, GH 의 경우 - *Spe* I 과 *Xba* I 으로 소화시킴.)로 소화시키고 시판되고 있는 클로닝 벡터

5 피블루스크립트 케이에스투(+) [pBluescript KSII(+)] (Stratagene, USA)]의 *EcoR* I/*Xba* I, *Spe* I/*Xba* I 부위에 삽입하여 클로닝하였다. 클로닝된 G-CSF 수용체 세포외부분 *EcoR* I/*Xba* I 으로 소화시키고, 클로닝된 human IgG1 Fc 부분을 *EcoR* I/*Xba* I 으로 소화시킨 단편을 ligation 시켜서 G-CSF 수용체와 human human IgG1 Fc 부분이 연결된 DNA 를 제조하였다. GH 수용체

10 세포외부분은 *Spe* I/*Xba* I 으로 소화시키고, 클로닝된 human IgG1 Fc 부분을 *Spe* I/*Xba* I 으로 소화시킨 단편을 ligation 시켜서 GH 수용체와 human human IgG1 Fc 부분이 연결된 DNA 를 제조하였다. 이를 G-CSF 수용체는 *Hind* III/*Xba* I 을 이용하여 절단한 후 피씨알-3 발현벡터에 삽입하여 클로닝하였으며, GH 수용체는 *EcoR* I/*Xba* I 을 이용하여 절단한 후 피씨알-3 발현벡터에 삽입하여

15 클로닝하였다.

<표 6>

G-CSF 수용체 및 GH 수용체의 제조에 이용되는 프라이머 서열

	프라이머 번호		핵산 서열	서열번호
G-CSF 수용체	56	센스	5'-CCCAAGCTTATGGCTGGACCTGCCACCC-3'	59
	57	안티센스	5'-GGAATTGCAACAGAGCCAGGCAGTTCCA-3'	60
GH 수용체	58	센스	5'-CGGAATTCAATGGATCTCTGGCAGCTG-3'	61
	59	안티센스	5'-GGACTAGTTTGGCTCATCTGAGGAAGTG-3'	62
IgG1-F- <i>EcoR</i> I	60	센스	5'-GGAATTGCGAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGTC-3'	63
IgG1-F- <i>Spe</i> I	61	센스	5'-GACTAGTGCAGAGCCCAAATCTTGTGA-3'	64
IgG1-R- <i>Xba</i> I	62	안티센스	5'-GCTCTAGAGCTCATTTACCGGAGACAGGGAGAG-3'	65

20 실시예 5. ELISA를 이용하여 본 발명에 따른 변이체와 해당 수용체간의 결합 친화력 측정

A. TPO와 TPO 수용체

실시에 4에서 수득한 재조합 발현 벡터를 상기 기술된 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용하여 햄스터 난소 세포에서 발현시키고 이로부터 얻어진 배양액을 다음의 리간드-수용체 결합 친화력을 측정하는데 사용하였다. 96-웰 플레이트에 안티-Ig 항체(anti-human Ig antibody)를 코팅용액(0.1M sodium bicarbonate, pH 9.6)을 사용하여 10ug/ml이 되게 희석하였다. 구(well) 당 100ul씩 분주하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액(0.1% Tween-20 함유 PBS)으로 3회 세척한 후 TPO 수용체가 발현된 상층액을 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세척용액으로 3번 세척한 후 각각의 TPO 변이체를 농도별로 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액으로 다시 3번 세척한 후 바이오티닐레이티드 안티-TPO 항체(biotinylated anti-EPO antibody, R&D, USA)를 이용하여 1시간 동안 반응시켰다. 세척용액으로 3번 세척한 후 스트렙타비딘-에이치알피 항체[Streptavidin-HRP antibody (serotec, USA)]를 이용하여 1시간 더 반응시켰다. 세척용액으로 3번 세척후 티엠비 마이크로웰 퍼옥시다아제 서브스트레이트 시스템 [TMB microwell peroxidase substrate system (KPL, USA)]을 이용하여 발색시키고, 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)로 파장 655nm에 대한 흡광도를 측정하였으며, 이의 결과는 도 4a에 나타내었다.

도 4a에서 알 수 있는 바와 같이 TPO-[F141V]가 가장 높은 결합 친화력을 보여주고 있으며 TPO-[F131V]는 야생형 TPO 보다 약간 높은 결합 친화력을 나타내었다.

B. EPO와 EPO 수용체

실시에 4에서 수득한 발현 벡터를 상기 기술된 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용하여 햄스터 난소 세포에서 발현하고 이로부터 얻어진 배양액을 리간드-수용체 결합 친화력을 측정하는데 사용하였다. ELISA를 이용하여 본 발명의 EPO 변이체와 EPO 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 방법은 전술한

TPO와 TPO 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 절차와 동일하게 진행되었다. 해당 결과는 도 4b에 나타내었다.

도 4b에서 알 수 있는 바와 같이 EPO-[F148V]가 가장 높은 결합 친화력을, 그 다음 EPO-[F142V], 야생형 EPO 순으로 나타났다.

5

C. G-CSF 와 G-CSF 수용체

실시에 4에서 수득한 발현 벡터를 상기 기술된 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용하여 햄스터 난소 세포에서 발현하고 이로부터 얻어진 배양액을 리간드-수용체 결합 친화력을 측정하는데 사용하였다. ELISA를 이용하여 본 발명의 G-CSF 변이체와 G-CSF 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 방법은 전술한 TPO와 TPO 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 절차와 동일하게 진행되었다. 해당 결과는 도 4c에 나타내었다.

도 4c에서 알 수 있는 바와 같이 G-CSF-[F140V]가 가장 높은 결합 친화력을 보여주고 있으며 그 다음 G-CSF-[F113V], 야생형 G-CSF 순으로 나타났다. G-CSF-[F144V] 및 G-CSF-[F160V]는 야생형 G-CSF 보다 약간 낮은 결합 친화력을 나타내었다.

15

D. GH 과 GH 수용체

실시에 4에서 수득한 발현 벡터를 상기 기술된 지질-매개 트랜스펙션 방법을 이용하여 햄스터 난소 세포에서 발현하고 이로부터 얻어진 배양액을 리간드-수용체 결합 친화력을 측정하는데 사용하였다. ELISA를 이용하여 본 발명의 GH 변이체와 GH 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 방법은 전술한 TPO와 TPO 수용체간의 결합 친화력을 측정하는 절차와 동일하게 진행되었다. 해당 결과는 도 4d에 나타내었다.

도 4d 에서 알 수 있는 바와 같이 GH-[F139V]가 가장 높은 결합 친화력을 보여주고 있으며 그 다음 GH-[F176V], GH-[F166V], 야생형 GH 순으로 나타났다.

25

실시에 6. SPR 검사법을 이용한 본 발명의 변이체와 해당 수용체간의 결합 친화력 측정

A. TPO 변이체

- 5 TPO-[F141V] 또는 TPO-[F131V]와 실시에 4에서 제조한 TPO 수용체간의 결합 친화력의 차이를 측정하기 위하여 에스피알 [SPR (surface plasmon resonance)] 검사를 수행하였다. 에스피알 검사는 수용체-리간드 또는 수용체-항체 사이의 결합 친화력을 측정하기 위한 실험으로 수용체에 리간드가 결합하게 되면 밀도가 증가하게 되어 그 양의 변화를 측정하여 얼마나 결합
10 친화력을 가지고 있는지 비교하는 것이다.

- 먼저 센서 칩(sensor chip)을 넣어 도킹(docking)한 다음에, 미세유로와 칩에 완충액을 흘려주어 프라이밍(priming)을 하고, 20~30% 글리세롤을 이용하여 노말라이징(normalising)시킨다. 노말라이징(normalising) 용액으로 세척한 다음, 미세유로와 칩을 다시 완충용액으로
15 채운다. 안티-휴먼 IgG 항체(anti-human IgG antibody)에 가장 잘 붙는 조건을 맞추기 위해서 소듐 아세테이트 (pH4~6)의 pH를 조절하여 프리콘센트레이션(preconcentration) 검사를 실시하고, 칩이 활성화할 수 있는 잔기를 가지도록 활성화 단계를 거친 다음, 10분 이내에 고정화하도록 한다. 1M 에탄올아민(ethanolamine)으로 나머지 활성화 잔기를 불활성화시키고, TPO
20 수용체를 흘려주어 안티-휴먼 IgG 항체(anti-human IgG antibody)와 결합할 수 있도록 한 다음, 야생형 TPO/TPO-[F141V]/TPO-[F131V]를 각각 다시 흘려주어 TPO 수용체와 결합시킨 후, 염 또는 산성 용액을 사용하여 TPO 수용체와 결합한 각각의 TPO들을 분리시켜준다.

- 도 5a는 야생형 TPO 및 TPO-[F141V]에 대한 SPR 검사 결과를 나타낸
25 것이다. 일반적으로, 같은 농도의 리간드를 넣어주었을 때 RU(resonance unit)가 높을수록 그 수용체에 대한 결합 친화력이 더 크다는 것을 의미한다. 상기 도면에 따르면, 야생형 TPO가 10RU임에 비해서TPO-[F141V]는 30RU, TPO-[F131V]는 20RU를 나타내었다. 이는 TPO-[F141V]가 TPO 수용체에 대해서 가장

높은 결합 친화력을 가진다는 것을 보여준다. 추가로, 본 발명에 따른 TPO 변이체의 동력상수 변화를 표 7에 정리하였다.

<표 7>

5 본 발명에 따른 TPO 변이체와 야생형 TPO의 동력상수

	$K_{on}(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_{off}(S^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_D(\mu M) = K_{off}/K_{on}$	Chi^2	친화력의 증가정도
야생형 TPO	2.42	13.7	5.66	5.81	1
TPO-[F141V]	12.8	0.51	0.04	6.03	141

B. EPO 변이체

EPO-[F148V] 또는 EPO-[F142V]와 실시예 4에서 제조된 EPO 수용체간의 결합 친화력의 차이를 측정하기 위하여 전술한 TPO 변이체에 대한 SPR 검사와
10 동일한 방식으로 SPR 검사를 수행하였다.

도 5b는 EPO 수용체에 대한 EPO 변이체들의 결합 친화력을 보여주는 결과로서, EPO-[F148V]는 40RU로, EPO-[F142V]는 30RU로 나와서 F148V로
치환된 EPO 변이체가 EPO 수용체와 가장 결합 친화력이 크다는 것을 확인할 수
있었다. 추가로, 본 발명에 따른 EPO 변이체의 동력상수 변화를 표 8에
15 정리하였다.

<표 8>

본 발명에 따른 EPO 변이체와 야생형 EPO의 동력상수

	$K_{on}(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_{off}(S^{-1}) \times 10^{-2}$	$K_D(\mu M) = K_{off}/K_{on}$	Chi^2	친화력의 증가정도
야생형 EPO	1.84	8.83	4.80	4.55	1
EPO-[F148V]	14.0	0.64	0.05	2.26	105

20 실시예 7. FACS를 이용한 본 발명의 변이체와 해당 수용체간의 결합
친화력 측정

A. TF-1/*c-Mpl* 세포의 제조

본 발명에 따른 TPO 또는 EPO 변이체의 해당 수용체에 대한 결합 친화력을 측정하기 위해서 상기 분석에 필요한 TF-1/*c-Mpl* 세포를 제조하였다.
5 이 세포는 EPO 수용체를 발현하고 있는 TF-1 세포에 지속적으로 TPO 수용체를 발현하도록 *c-Mpl*을 트랜스펙션하여 구축하였다.

한편, 이렇게 제조된 TF-1/*c-Mpl* 세포가 *c-Mpl*을 지속적으로 발현하고 있는지 여부를 확인하기 위해서 먼저 *c-Mpl*에 대한 팩스 분석을 실시하였다. ml 당 1×10^6 개의 TF-1/*c-Mpl* 세포를 1배 인산완충용액으로 세척하고 정제된 *c-Mpl* 마우스 안티-휴먼 모노클로날 항체 [*c-Mpl* purified mouse anti-human monoclonal antibody (BD PharMingen, USA)]를 처리한 다음 안티-마우스 IgG FITC 콘쥬게이트 [Anti-mouse IgG (whole molecule) FITC conjugate (Sigma, USA)]를 붙인 다음 팩스를 수행하였다. 그 결과 음성대조군인 TF-1 세포에서보다 TF-1/*c-Mpl* 세포에서 그래프가 오른쪽으로 이동한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 TF-1/*c-Mpl* 세포에서 *c-Mpl*이 지속적으로 발현되고 있음을 의미한다.
10
15

B. TPO 변이체

TPO-[F141V]에 대한 팩스 분석을 다음과 같이 수행하였다. ml 당 1×10^6 개의 TF-1/*c-Mpl* 세포를 1배 인산완충용액에 부유시키고, TPO 변이체를 처리하여 4°C에서 30~60분간 배양하였다. 그리고 바이오티닐레이티드 고트 안티-휴먼 TPO 폴리클로날 항체 [Biotinylated goat anti-human TPO polyclonal antibody (R&D, USA)]를 4°C에서 30~60분간 처리하고, 스트렙타비딘-에프아이티씨 [streptavidin-FITC (Sigma, USA)] 용액을 처리하여 다시 4°C에서 30~60분간 배양하였다. 세포를 1배 인산완충용액으로 2회 세척하여 반응하지 않은 스트렙타비딘-에프아이티씨(streptavidin-FITC)를 제거하고 세포를 1배 인산완충용액에 부유시켜 488nm에서 세포유동분석법(flow cytometric analysis)를 수행하였다.
20
25

도 6a는 TPO 수용체인 *c-Mpl*에 대한 야생형 TPO 및 TPO-[F141V]의 결합 친화력을 나타낸 것으로, 그 결과 TPO-[F141V]의 그래프가 야생형 TPO보다 더 오른쪽으로 이동한 것을 볼 수 있었다. 이것은 *c-Mpl*과 결합한 리간드의 양이 야생형 TPO보다 TPO-[F141V]가 더 많다는 것이고, 따라서 이는 TPO 수용체에
5 대한 결합 친화력은 TPO-[F141V]가 동일한 농도의 야생형 TPO보다 더 높다는 것을 검증한다.

C. 본 발명에 따른 EPO 변이체

EPO-[F148V]에 대한 팩스 분석은 전술한 TPO 변이체에 대한 팩스
10 분석과 동일한 절차로 수행하였다.

도 6b는 EPO 수용체에 대한 야생형 EPO 및 EPO-[F148V]의 결합 친화력을 나타낸 것으로, 그 결과 EPO-[F148V]의 그래프가 야생형 EPO보다 더 오른쪽으로 이동한 것을 볼 수 있었다. 이것은 EPO 수용체와 결합한 리간드의 양이 야생형 EPO보다 EPO-[F148V]가 더 많다는 것이고, 따라서 이는 EPO
15 수용체에 대한 결합 친화력은 EPO-[F148V]가 같은 농도의 야생형 EPO 보다 훨씬 더 높다는 것을 증명하고 있다.

8 실시예 8. 생물학적 활성도 측정

20 A. TPO 변이체

야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체들 각각의 분열 증식과 활성 효과를 측정하기 위하여 앞서 제조된 TF-1/*c-Mpl* 세포를 사용하였다. TF-1/*c-Mpl* 세포는 10% 우태아 혈청, 1ng/ml GM-CSF 함유 디엠이엠, 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다. 이러한 TF-1/*c-Mpl* 세포를 96- 구
25 효소면역검사판 [96-well plate (FALCON, USA)]에 총량이 100 μ l가 되도록, 우선 야생형 TPO 및 본 발명에 따른 TPO 변이체들을 각각 0.4, 1, 5, 10, 20, 40, 75 ng/ml 범위가 되도록 10% 우태아 혈청 함유 알피엠아이-1640으로 희석하여 넣고 TF-1/*c-Mpl* 세포는 구당 1 \times 10⁴개의 세포가 되도록 10% 우태아

혈청 함유 알피엠아이-1640으로 희석하여 넣어 주었다. 이것을 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 4일간 배양한 후 MTS 용액 [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS] 및 phenazine ethosulfate; PES ;promega)] 을 20 μ l씩 첨가한 후 4시간 동안
5 반응시키고 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model 550)]로 파장 490 nm에 대한 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였다.

상기 과정 이전에 선행 실험을 통해서 각 구에 들어가는 세포 수와 TPO/EPO에 대한 반응 시간을 알아보았다. 각각의 최대 증식률을 비교해 본 결과 세포 수는 구당 1×10^4 개의 세포로 정하였으며, TPO/EPO와 반응 후 MTS
10 용액을 처리하는 시간은 4일 후로 결정하였다.

도 7a는 본 발명에 따른 TPO 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를 나타낸 것으로, TPO의 세포 증식 정도는 TPO 농도 0.4ng/ml에서 75ng/ml 범위에서 실험을 수행하였다. TPO의 농도가 50ng/ml까지는 세포 증식 정도가 모두 증가하였으나, 그 농도 이상이 되면서부터 세포 증식력이 오히려
15 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. TPO-[F141V]는 0.4ng/ml 가량의 농도에서 세포 증식이 시작되었고, 야생형 TPO보다 높은 생물학적 활성도를 나타내었다. TPO-[F131V]는 TPO-[F141V] 보다는 현저히 낮았고 야생형보다는 약간 높았다. TPO-[F46V]는 야생형 TPO와 유사한 활성도를 나타내었다.

20 B. EPO 변이체

앞서 제조된 EPO 변이체에 대한 분열 증식과 활성 효과의 측정은 전술한 TPO 변이체의 분열 증식과 활성 효과를 측정하는 방식과 동일한 절차로 수행되었다.

도 7b는 본 발명에 따른 EPO 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를 나타낸 것으로, EPO의 세포 증식 정도는 EPO 농도 0.01 내지 7IU/ml 범위에서
25 실험을 수행하였다. TPO와 마찬가지로 EPO의 농도가 증가함에 따라 세포 증식력도 증가하였다가 적정 농도를 초과하게 되면 오히려 세포 증식 능력이 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. EPO-[F148V]가 가장 높은 생물학적

활성도를 나타내었으며, EPO-[F138V]는 0.01IU/ml 가량의 농도에서 세포 증식이 시작되어 0.1IU/ml의 농도에서부터는 야생형 EPO보다 높은 활성도를 보였고 1IU/ml이 지남에 따라 활성도가 감소하는 경향을 보였다. EPO-[F142V]는 EPO-[F148V] 보다는 약간 낮았고 EPO-[F48V]는 야생형보다 약간 낮은 경향을 보였다.

표 9 및 10은 각각 상기 생물학적 활성도 측정 결과를 토대로 하여 야생형 TPO와 EPO가 최대 활성도를 나타낼 때를 100%로 하여 각 변이체들의 효능을 비교한 것이다. TPO 변이체의 경우에는 TPO-[F141V]가 146%로 가장 높은 활성도를 나타내었고, 그 다음으로 TPO-[F131V]가 119%를 나타내었다. EPO 변이체는 EPO-[F148V]가 137%를 나타내어 가장 높은 활성도를 보여주었으며, 그 다음으로 EPO-[F142V]가 122%의 활성도를 나타내었다.

<표 9>

15 TPO의 생물학적 활성도

	TPO	최대활성도 비교(%)
야생형		100
변이체	TPO-[F46V]	107
	TPO-[F128V]	63
	TPO-[F131V]	119
	TPO-[F141V]	146

<표 10>

EPO의 생물학적 활성도

	EPO	최대활성도 비교(%)
야생형		100
변이체	EPO-[F48V]	84
	EPO-[F138V]	57
	EPO-[F142V]	122
	EPO-[F148V]	137

C. G-CSF 변이체

야생형 G-CSF 및 본 발명에 따른 G-CSF 변이체들 각각의 분열 증식과
활성 효과를 측정하기 위하여 HL60 세포를 사용하였다. HL60 세포는 10%
5 우태아 혈청 함유 디엠이엠, 5% 이산화탄소, 37℃ 배양기에서 배양하였다.
이러한 HL60 세포를 96-구 효소면역검사판 [96-well plate (FALCON, USA)]에
총량이 100 μ l가 되도록, 1.5% 농도의 DMSO 가 되도록 10% 우태아 혈청 함유
알피엠아이-1640 에 섞고 2 일간 배양하였다. 야생형 G-CSF 및 본 발명에 따른
G-CSF 변이체들을 각각 0.4, 1, 5, 10, 20, 40, 75 ng/ml 범위가 되도록 10%
10 우태아 혈청 함유 알피엠아이-1640 으로 희석하여 넣어 주었다. 이것을 5% CO₂,
37℃ 배양기에서 2 일간 배양한 후 MTS 용액 [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5- (3-
carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS]
및 phenazine ethosulfate; PES ;promega)] 을 20 μ l씩 첨가한 후 4 시간 동안
반응시키고 마이크로플레이트 리더 [microplate reader (BIO-RAD Model
15 550)]로 파장 490 nm 에 대한 흡광도를 측정하여 활성도를 측정하였다.

도 7c 는 본 발명에 따른 G-CSF 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를
나타낸 것으로, G-CSF 의 세포 증식 정도는 G-CSF 농도 0.4ng/ml에서 75ng/ml
범위에서 실험을 수행하였다. G-CSF 의 농도가 50ng/ml 까지는 세포 증식
정도가 모두 증가하였으나, 그 농도 이상이 되면서부터 세포 증식력이 오히려
20 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. G-CSF-[F140V]는 0.4ng/ml 가량의
농도에서 세포 증식이 시작되었고, 야생형 G-CSF 보다 매우 높은 생물학적
활성도를 나타내었다.

D. GH 변이체

25 앞서 제조된 GH 변이체에 대한 분열 증식과 활성 효과의 측정은
Nb2 세포를 이용하여 전술한 G-CSF 변이체의 분열 증식과 활성 효과를
측정하는 방식과 동일한 절차로 수행되었다.

도 7d 는 본 발명에 따른 GH 변이체의 생물학적 활성도 측정 결과를 나타낸 것으로, GH 의 세포 증식 정도는 GH 농도 0.4ng/ml에서 75ng/ml 범위에서 실험을 수행하였다. GH 의 농도가 50ng/ml 까지는 세포 증식 정도가 모두 증가하였으나, 그 농도 이상이 되면서부터 세포 증식력이 오히려 감소한다는 것을 확인할 수 있었다. GH-[F139V]는 0.4ng/ml 가량의 농도에서 세포 증식이 시작되었고, 야생형 GH 보다 매우 높은 생물학적 활성도를 나타내었다.

실시예 1. 본 발명에 따른 EPO/TPO 변이체 및 야생형 EPO/TPO 의 약물
10 동력 검사

토끼(NewZealand White, 3kg)에 야생형 또는 변이체 EPO/TPO 를 정맥주사하고, 귀에서 혈액을 시간별로 채취 및 분리한 다음 상기 명시된 ELISA 방법으로 혈액내 EPO 와 TPO 의 농도를 검사하였다. 또한, 본 발명에 따른 야생형 및 변이체 EPO 의 약물동력 검사를 위해 마우스에 복강주사하고
15 혈액을 채취한 다음 채취된 혈액을 상온에 3 시간 방치한 후 원심분리 (3,000rpm, 10 분)하였다. 상층액을 상기 ELISA 방법을 이용해서 혈중 EPO 의 양을 측정하여 시간에 따른 혈중 농도를 검사하였다..

도 8a 는 야생형 TPO 와 변이체 TPO-[F141V]를 토끼에 5 μ g/kg 의 양으로 정맥주사 후 혈중 농도를 측정한 결과이다. 시간이 지나면서 변이체 TPO-
20 [F141V]의 혈중 농도가 야생형보다 급격하게 감소하는 것을 확인하였는데, 이는 TPO-[F141V]가 야생형 보다 수용체와의 결합 친화력이 높기 때문에 혈액에서 목표하는 조직으로 빨리 빠져나가기 때문이다.

도 8b 는 야생형 및 변이체 EPO-[F148V]를 1000I.U/kg 정맥주사 후 혈중 농도를 측정한 결과이다. 정맥주사 후 초기에는 농도가 비슷하였으나, 시간이
25 지나면서 변이체 EPO-[F148V]의 혈중 농도가 급격하게 야생형보다 감소하는 것을 확인하였다.

도 8c 는 야생형 및 변이체 EPO-[F148V]의 약물동력 검사를 마우스 [mouse (12 주령 Balb/c, 30g, 중앙동물실험, Korea)]를 사용하여 실시한

결과로서, 야생형 및 변이체 EPO-[F148V]를 20 I.U/g 복강주사 후 혈중 농도를 측정된 결과이다. 복강주사 후 초기 혈액으로 퍼지는 속도는 야생형 EPO 가 변이체 EPO-[F148V]보다 빠르며, 혈중최고농도 (Cmax) 값도 야생형 EPO 가 높음을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명에 의한 변이체 EPO-[F148V]가 야생형 EPO 보다 소수성(hydrophobic)이며, 수용체와의 결합 친화력이 높기 때문에 나타나는 결과임을 알 수 있다. 혈중으로 확산 후 목표 조직으로 나가는 속도도 정맥주사의 경우에서처럼 변이체 EPO-[F148V]가 빠름을 확인하였다.

10 <표 11>

본 발명에 따른 EPO 변이체와 야생형의 약물동력검사 수치

	마우스		래비트	
	야생형 EPO	EPO-[F148V]	야생형 EPO	EPO-[F148V]
T _{1/2} (반감기)	1.9	1.4	3.8	2.4
AUC	100	78	100	80

실시에 8. 본 발명에 따른 EPO 변이체의 생체내 활성증가 검사

먼저 마우스[mouse (12 주령 Balb/c, 30g, 중앙동물실험, Korea)]를 700Rad 감마선 조사(γ -irradiation)하여 조혈에 관여하는 세포들을 죽인 다음, 정제된 야생형 또는 EPO 변이체를 복강 주사하고, 꼬리에서 혈액을 50 μ l씩 채취한 후 CBC (complete blood counting) 검사를 수행하여 *in vivo* 상에서 EPO 변이체의 효능을 확인하였다.

정제된 야생형 EPO 와 EPO 변이체를 각각 250ng 씩 감마선 조사한 날로부터 3 일 동안 3 회로 나누어 복강 주사하였으며, 양성 대조군은 야생형 EPO 로, 음성 대조군은 햄스터 난소 세포 배양액으로 하여 실험하였다. 혈액은 주사한지 0 일, 1 일, 2 일, 4 일, 7 일, 10 일, 15 일, 20 일, 25 일, 30 일에 걸쳐서 채취하였으며, EDTA 가 들어있는 튜브에 넣어 혈액응고를 방지하였다.

도 9a 및 9b 는 EPO 를 복강 주사한 마우스의 CBC 검사결과를 나타낸 것으로 적혈구, 망상적혈구의 수치변화를 알아보았다. 적혈구는 감마선 조사한지 0 일~5 일 사이에 급격하게 감소하다가 5 일이 지나면서 증가하기 시작하였다. EPO-[F148V]와 EPO-[F142V] 변이체는 야생형 EPO 보다 높은 수치를 보였고, EPO-[F48V]와 EPO-[F138V] 변이체는 야생형 EPO 보다 낮은 수치의 적혈구 증가를 나타내었다. 망상적혈구는 적혈구와 비슷한 결과를 나타냄을 확인하였다. 한편, 도 9c 는 EPO 를 복강 주사한 마우스의 hematocrit 변화를 검사한 결과로서, 야생형 EPO 보다 EPO-[F148V]가 hematocrit 의 변화가 높음을 확인할 수 있었다.

10

실시에 9. 본 발명에 따른 TPO 변이체의 생체내 활성증가 검사

본 발명에 따른 TPO 변이체가 조혈작용에 미치는 영향을 보기 위해서 *in vivo* assay를 수행하였다. 먼저 랫트 [Rat (8주령 암컷 SD, 250g, 샘타코, Korea)]을 700Rad 감마선 조사(γ -irradiation)하여 조혈에 관여하는 세포들을 죽인 다음, 정제된 야생형 또는 TPO 변이체를 복강 주사하고, 꼬리에서 혈액을 200 μ l씩 채취한 후 CBC (complete blood counting) 검사를 수행하여 *in vivo*상에서 TPO 변이체의 효능을 확인하였다.

정제된 야생형 TPO와 TPO 변이체를 각각 7500ng씩 감마선 조사한 날로부터 4일 동안 4회로 나누어 복강 주사하였으며, 양성 대조군은 야생형 TPO로, 음성 대조군은 햄스터 난소 세포 배양액으로 하여 실험하였다. 혈액은 주사한지 0일, 1일, 7일, 10일, 14일, 18일, 23일, 28일, 32일에 걸쳐서 채취하였으며, EDTA가 들어있는 튜브에 넣어 혈액응고를 방지하였다.

도 10은 TPO를 복강 주사한 랫트의 CBC 검사결과를 나타낸 것으로 혈소판, 적혈구, 백혈구, 림프구, 중성구의 수치변화를 알아보았다. 혈소판은 감마선 조사한지 0일~7일 사이에 급격하게 감소하였다가 7일이 지나면서 증가하기 시작하였다. TPO-[F131V]와 TPO-[F141V]는 야생형 TPO보다 높은 수치를 보였고, TPO-[F46V]는 야생형 TPO와 유사한 수치의 혈소판 증가를 나타내었다. 그런데 TPO-[F128V]는 음성대조군과 비슷한 양상을 보여

조혈작용에 효과가 적음을 확인할 수 있었다. 적혈구와 림프구는 감마선 조사를 하고 난 후에도 급격한 감소를 보이지 않았고, TPO 변이체를 주사하였을 때도 수치에 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있었다(도시하지 않았음). 백혈구와 중성구는 감마선 조사 후 0일~7일 사이에 급격하게 감소하였는데, 7일이 지나면서 회복이 되는 양상을 보였다. 23일경에는 TPO-[131V]와 TPO-[F141V]는 야생형 TPO보다 높은 백혈구 수치를 나타내었고, TPO-[F46V]는 야생형보다 낮은 수치를 보였다. 그러나 TPO-[F128V]는 혈소판 결과에서와 마찬가지로 음성대조군과 비슷한 수치변화를 보여주었다. 이런 결과로 볼 때 TPO는 혈소판과 백혈구 및 중성구의 생성에 영향을 주는 것을 알 수 있으며, 야생형 TPO와 비교하였을 때, TPO 변이체 중에서도 TPO-[F131V] 보다는 TPO-[F141V]가 더 높은 활성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

산업상 이용 가능성

이상의 본 발명의 결과들은 기존의 야생형 생리활성 조절 단백질들의 해당 수용체, 리간드 혹은 기질과의 결합에 관여하는 도메인내 페닐알라닌을 발린으로 치환시켰을 때 야생형 단백질 보다 증가된 결합 친화력과 생물활성 등의 유도할 수 있고, 또 기존 단백질 변이체의 자가항체 생성등의 문제점도 보완이 가능하여 우수한 개량형 약제 단백질의 제조가 가능해진다.

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 45쪽 1-15줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학 재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징	이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□
기탁기관 한국미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재) 한국미생물 보존센터(KCCM) (120-091) 대한민국 서울시 서대문구 홍제동 361-221 유림빌딩	
기탁날짜	2003. 06.09 기탁번호 KCCM-10500
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 다음 페이지에 계속□	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임 (표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 기재란	국제사무관 기재란
<input type="checkbox"/> 국제출원과 함께 수리되었음	<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관	담당관

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 46쪽 15-27줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학 재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징	이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□
기탁기관 한국미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재) 한국미생물 보존센터(KCCM) (120-091) 대한민국 서울시 서대문구 홍제동 361-221 유림빌딩	
기탁날짜	2003. 06.09 기탁번호 KCCM-10501
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 다음 페이지에 계속□	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임 (표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 기재란
<input type="checkbox"/> 국채출원과 함께 수리되었음
담당관

국제사무관 기재란
<input type="checkbox"/> 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관

기탁된 미생물 또는 기타 생물학적 재료의 표시사항

A. 하기의 표시사항은 명세서 48쪽 15-27줄에 기재된 기탁 미생물 또는 기타 생물학 재료에 관한 것임.	
B. 기탁물의 특징 이외의 추가적 기탁물은 다음 별도의 페이지에 기재□	
기탁기관 한국미생물 보존센터(KCCM)	
기탁기관의 주소지(우편번호 및 국명 기재) 한국미생물 보존센터(KCCM) (120-091) 대한민국 서울시 서대문구 홍제동 361-221 유림빌딩	
기탁날짜 2004. 05.17	기탁번호 KCCM-10571
C. 추가적 표시 사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출) 별도의 다음 페이지에 계속□	
D. 표시사항이 지정하고 있는 특징적 사항	
E. 별도의 보충적 표시사항(기재사항이 없으면 공란으로 제출)	
하기의 별도 표시사항은 후에 국제사무국에 제출될 것임 (표시사항의 일반적 성질을 특정할 것)	

수리관청 기재란	국제사무관 기재란
□ 국제출원과 함께 수리되었음	□ 국제사무국에 의하여 수리되었음
담당관	담당관

특허청구범위

1. 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한
5 단백질 변이체.

2. 제 1항에 있어서, 상기 단백질이 사이토카인인 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

10 3. 제 2항에 있어서, 상기 사이토카인이 4-알파 나선 다발 소속 사이토카인인 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

4. 제 3항에 있어서, 상기 4-알파 나선 다발 소속 사이토카인이 CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35,
15 LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO, IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω 및 IFN- τ 로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

5. 제 4항에 있어서, 상기 CNTF, EPO, Flt3L, G-CSF, GM-CSF, GH, IL-2,
20 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12p35, LPT, LIF, M-CSF, OSM, PL, SCF, TPO는 110번째 내지 180번째 아미노산 잔기 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

6. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- β , IFN- γ , IFN- ω 및 IFN- τ 는 1번째 내지 50번째 아미노산 잔기 중 페닐알라닌을 발린으로
25 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

7. 제 4항에 있어서, 상기 CNTF는 서열번호: 1에 기재된 아미노산 서열

중 3번째, 83번째, 98번째, 105번째, 119번째, 152번째 또는 178번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

8. 제 4항에 있어서, 상기 EPO는 서열번호: 2에 기재된 아미노산 서열
5 중 48번째, 138번째, 142번째 또는 148번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

9. 제 4항에 있어서, 상기 Flt3L는 서열번호: 3에 기재된 아미노산
10 서열 중 6번째, 15번째, 81번째, 87번째, 96번째 또는 124번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

10. 제 4항에 있어서, 상기 G-CSF는 서열번호: 4에 기재된 아미노산
서열 중 13번째, 83번째, 113번째, 140번째, 144번째 또는 160번째
15 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

11. 제 4항에 있어서, 상기 GM-CSF는 서열번호: 5에 기재된 아미노산
서열 중 47번째, 103번째, 106번째, 113번째 또는 119번째 페닐알라닌을
발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

12. 제 4항에 있어서, 상기 GH는 서열번호: 6에 기재된 아미노산 서열
20 중 1번째, 10번째, 25번째, 31번째, 44번째, 54번째, 92번째, 97번째, 139번째,
146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을
특징으로 하는 단백질 변이체.

13. 제 4항에 있어서, 상기 IL-2는 서열번호: 13에 기재된 아미노산
25 서열 중 42번째, 44번째, 78번째, 103번째, 117번째 또는 124번째
페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

14. 제 4항에 있어서, 상기 IL-3는 서열번호: 14에 기재된 아미노산 서열 중 37번째, 61번째, 107번째, 113번째 또는 133번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

5 15. 제 4항에 있어서, 상기 IL-4는 서열번호: 15에 기재된 아미노산 서열 중 33번째, 45번째, 55번째, 73번째, 82번째 또는 112번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

10 16. 제 4항에 있어서, 상기 IL-5는 서열번호: 16에 기재된 아미노산 서열 중 49번째, 69번째, 96번째 또는 103번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

15 17. 제 4항에 있어서, 상기 IL-6은 서열번호: 17에 기재된 아미노산 서열 중 73번째, 77번째, 93번째, 104번째, 124번째, 169번째 또는 172번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

20 18. 제 4항에 있어서, 상기 IL-12p35는 서열번호: 18에 기재된 아미노산 서열 중 13번째, 39번째, 82번째, 96번째, 116번째, 132번째, 150번째, 166번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

25 19. 제 4항에 있어서, 상기 LPT는 서열번호: 19에 기재된 아미노산 서열 중 41번째 또는 92번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

20. 제 4항에 있어서, 상기 LIF는 서열번호: 20에 기재된 아미노산 서열 중 41번째, 52번째, 67번째, 70번째, 156번째 또는 180번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

21. 제 4항에 있어서, 상기 M-CSF는 서열번호: 21에 기재된 아미노산 서열 중 35번째, 37번째, 54번째, 67번째, 91번째, 106번째, 121번째, 135번째, 143번째, 229번째, 255번째, 311번째, 439번째, 466번째 또는 485번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

22. 제 4항에 있어서, 상기 OSM는 서열번호: 22에 기재된 아미노산 서열 중 56번째, 70번째, 160번째, 169번째, 176번째 또는 184번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

10

23. 제 4항에 있어서, 상기 PL은 서열번호: 23에 기재된 아미노산 서열 중 10번째, 31번째, 44번째, 52번째, 54번째, 92번째, 97번째, 146번째, 166번째, 176번째 또는 191번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

15

24. 제 4항에 있어서, 상기 SCF는 서열번호: 24에 기재된 아미노산 서열 중 63번째, 102번째, 110번째, 115번째, 116번째, 119번째, 126번째, 129번째, 158번째, 199번째, 205번째, 207번째 또는 245번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

20

25. 제 4항에 있어서, 상기 TPO는 서열번호: 25에 기재된 아미노산 서열 중 46번째, 128번째, 131번째, 141번째, 186번째, 204번째, 240번째 또는 286번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

26. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- α 2A는 서열번호: 7에 기재된 아미노산 서열 중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째, 123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

27. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- α 2B는 서열번호: 8에 기재된 아미노산
서열 중 27번째, 36번째, 38번째, 43번째, 47번째, 64번째, 67번째, 84번째,
123번째 또는 151번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는
5 단백질 변이체.

28. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- β 는 서열번호: 9에 기재된 아미노산
서열 중 8번째, 38번째, 50번째, 67번째, 70번째, 111번째 또는 154번째
페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

10

29. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- γ 는 서열번호: 10에 기재된 아미노산
서열 중 18번째, 32번째, 55번째, 57번째, 60번째, 63번째, 84번째, 85번째,
95번째 또는 139번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는
단백질 변이체.

15

30. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- ω 는 서열번호: 11에 기재된 아미노산
서열 중 27번째, 36번째, 38번째, 65번째, 68번째, 124번째 또는 153번째
페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는 단백질 변이체.

20 31. 제 4항에 있어서, 상기 IFN- τ 는 서열번호: 12에 기재된 아미노산
서열 중 8번째, 39번째, 68번째, 71번째, 88번째, 127번째, 156번째, 157번째,
159번째 또는 183번째 페닐알라닌을 발린으로 치환한 것을 특징으로 하는
단백질 변이체.

25 32. 제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 따른 단백질 변이체를
코딩하는 DNA.

33. 제 32항에 따른 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현

백터.

34. 제 33항에 있어서, 상기 재조합 발현 백터가 기탁번호 KCCM-10500, KCCM-10501 또는 KCCM-10571인 것을 특징으로 하는 재조합 발현 백터.

5

35. 제 33항 또는 제34항에 따른 재조합 발현 백터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포.

36. 제 35항에 따른 숙주세포를 배양하고 이로부터 단백질 변이체를
10 분리하는 단계를 포함하는 단백질 변이체의 제조방법.

37. 제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 따른 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

요약서

본 발명은 수용체, 리간드 또는 기질과 결합하여 생리활성 조절작용을 나타내는 단백질의 결합 도메인내 아미노산 중 페닐알라닌을 발린으로 치환한 단백질 변이체, 이 변이체를 코딩하는 DNA, 이 DNA가 벡터에 작동가능하게 연결된 재조합 발현 벡터, 이 재조합 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주세포, 이 숙주세포를 배양하고 이의 배양물로부터 상기 단백질 변이체를 분리하는 단계를 포함한 단백질 변이체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단백질 변이체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.